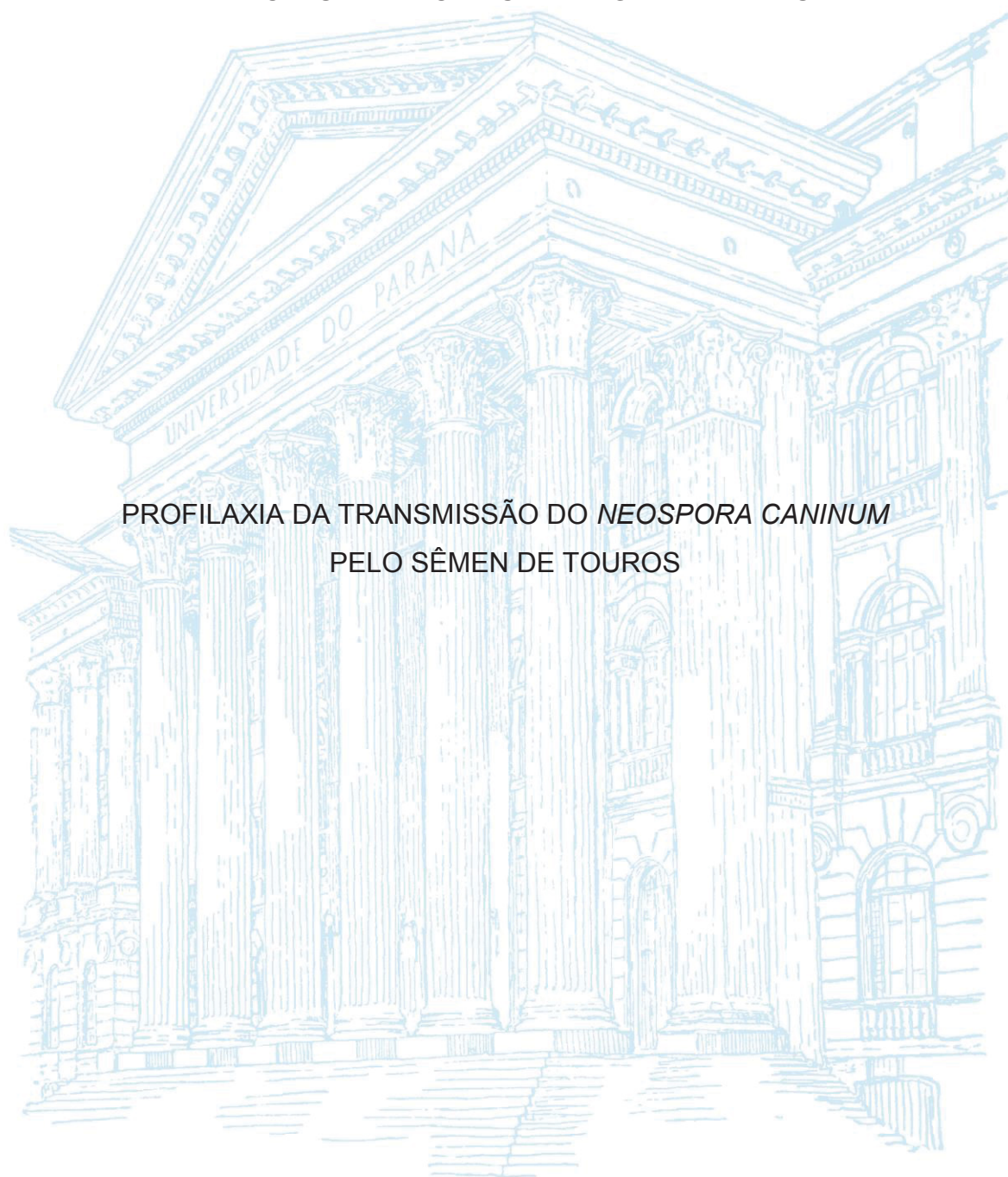


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLAUDIA MACHINSKI RANGEL DE ABREU



PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO DO *NEOSPORA CANINUM*
PELO SÊMEN DE TOUROS

CURITIBA

2018

ANA CLAUDIA MACHINSKI RANGEL DE ABREU

PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO DO *NEOSPORA CANINUM*
PELO SÊMEN DE TOUROS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, área de concentração: Saúde Animal e Humana, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Vanete Tomaz Soccol

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

A162p

Abreu, Ana Claudia Machinski Rangel de

Profilaxia da transmissão do *neospora caninum* pelo sêmen de touros.
/ Ana Claudia Machinski Rangel de Abreu– Curitiba, 2018.
74 p. : il. [algumas color.]; tabs. : 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, área de concentração: Saúde Animal e Humana.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Vanete Tomaz Soccol

1. Neosporose. 2. Bovinos. 2. Doença. I. Weiss, Romildo Romualdo. II. Soccol, Vanete Tomaz. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná. CDD 636.089696

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de ANA CLAUDIA MACHINSKI RANGEL DE ABREU intitulada: **Profilaxia da transmissão do *Neospora caninum* pelo sêmen do touro.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Março de 2018.

ROMILDO ROMBALDO WEISS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

TÁCIA GOMES BERGSTEIN GALAN
Avaliador Externo (UFPR)

ROSÂNGELA LOCATELLI DITTRICH
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Aos meus pais, Cleide e Celso, por viverem os meus sonhos comigo. E se fosse possível escolhê-los nas próximas vidas, escolheria.

Ao meu irmão, Rafael, por ser um grande exemplo de caráter e dignidade para mim e que com a Michelle estão me dando o melhor presente, o Tiago, meu sobrinho.

À toda minha família.

Às minhas amigas da graduação, Thais, Lari Casagrande e Lari Moreira, que mesmo cada uma seguindo seu caminho, sempre estivemos juntas, fisicamente ou em pensamento.

À Eduarda Busato por dividir comigo todas as dificuldades e por me ouvir sempre que eu precisei. A pessoa mais inteligente que já conheci!

À Melina Bertol que sempre me ajudou. Até mesmo antes do meu ingresso na pós-graduação. Você é um grande exemplo para mim!

Ao professor Dr. Romildo Romualdo Weiss pela orientação para execução do meu projeto e pelos ensinamentos que levarei por toda a minha vida. E pela confiança em mim quando permitiu que eu fosse trabalhar ao término do mestrado. Sentirei saudades!

À professora Dr^a. Rosangela Locatelli pela paciência e ensinamentos desde a graduação.

À Marília Koch que me ensinou a sobreviver dentro do laboratório de patologia clínica da UFPR. E que mesmo longe, sempre se mostrou preocupada comigo.

Ao professor Dr. Juan Carlos Duque Moreno pela ajuda com a estatística.

Aos alunos da graduação de Medicina Veterinária da UFPR pela paciência e cumplicidade durante as aulas que ministrei referentes à prática de docência.

Ao programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de aprimoramento na área de Reprodução Animal e à prof. Dr^a. Vanete Soccol pela co-orientação.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

Aos profissionais do centro de diagnóstico e biotecnologia em reprodução animal da FMVZ por permitirem a execução das análises do meu experimento.

E não menos importante, ao Donatello, meu cachorro, por sempre estar comigo no início do experimento e por participar das aulas prática de Reprodução Animal.

Rir é correr o risco de parecer tolo
Chorar é correr risco de parecer sentimental
Estender a mão é correr o risco de se envolver
Expor seus sentimentos é correr o risco de mostrar seu verdadeiro eu
Defender seus sonhos e ideias diante da multidão é correr o risco de perder as
pessoas
Amar é correr o risco de não ser correspondido
Viver é correr o risco de morrer
Confiar é correr o risco de se decepcionar
Tentar é correr o risco de fracassar
Mas os riscos devem ser corridos, porque o maior perigo é não arriscar nada
Há pessoas que não correm nenhum risco, não fazem nada, não têm nada e não
são nada
Elas podem até evitar sofrimentos e decepções, mas elas não conseguem nada,
não sentem nada, não mudam, não crescem, não amam e não vivem.

Sêneca

RESUMO

O conhecimento das vias de transmissão e do ciclo de vida do *Neospora caninum* é importante para a implementação de medidas de controle da doença. Como o DNA de *N. caninum* foi detectado no sêmen fresco e congelado de touros, estudos avaliaram a transmissão venérea do *N. caninum* em bovinos, classificando-a como via de transmissão horizontal. Por esse motivo, são necessárias medidas de precaução para o uso do sêmen de touros infectados com *N. caninum*. O presente trabalho é dividido em dois capítulos: o primeiro capítulo aborda uma revisão bibliográfica sobre Neosporose na espécie bovina e o segundo capítulo refere-se à condução dos experimentos 1 e 2 com o objetivo de desenvolver um diluente, para criopreservação de sêmen de touro, eficiente na profilaxia da transmissão venérea do *N. caninum*. O experimento 1 corresponde ao teste dos antimicrobianos - trimetoprim isolado (TRI) e associado à sulfadiazina (SDT) e à sulfametoxazol (SMT), claritromicina (CLA), eritromicina (ERI), azitromicina (AZI) e clindamicina (CLI) – o qual foi realizado utilizando cultivo celular inoculado com 10^4 taquizoítas de *N. caninum* que foi avaliado quanto à presença de taquizoítas livre e ao efeito citopático na monocamada por meio de microscópio invertido. Com os resultados obtidos a partir do teste dos princípios ativos e associações em cultivo celular, os antimicrobianos que se mostraram eficientes no controle dos taquizoítas *in vitro* foram utilizados no preparo do diluente para o sêmen. Cada meio diluidor foi avaliado quanto à toxicidade em relação às células espermáticas (experimento 2). O ejaculado bovino coletado foi dividido em 8 grupos, sendo que 7 grupos receberam um antibiótico no meio diluidor para criopreservação e 1 não recebeu (grupo controle). Foram realizadas análises de cinética espermática em sistema automatizado (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA), e reação acrossomal e potencial mitocondrial das amostras criopreservadas por citometria de fluxo. Os grupos não diferiram em relação ao grupo controle quanto aos parâmetros Amplitude de Deslocamento Lateral de Cauda (ALH), Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN). Os grupos SDT, SMT e AZI apresentaram menores valores ($P<0,05$) de Velocidade de Trajeto (VAP) em relação ao grupo controle. A Velocidade Progressiva (VSL) foi inferior nos grupos SMT e AZI ($P<0,05$) e a Frequência de Batimentos de Cauda (BCF) também foi inferior nos grupos CLI e AZI ($P<0,05$). Os valores de Velocidade Curvilínea (VCL) dos grupos SDT, SMT e CLA apresentaram-se menores que o grupo controle ($P<0,05$). Em relação à Motilidade Total (MT) e Motilidade Progressiva (MP), os grupos SMT, ERI e AZI apresentaram menores valores ($P<0,05$) quando comparados com o grupo controle. Da mesma forma, os grupos SMT e AZI apresentaram mais defeitos morfológicos. Quanto à citometria de fluxo, os grupos SDT, SMT e AZI apresentaram porcentagens significativamente maiores ($P<0,05$) de espermatozoides com reação acrossomal em relação ao grupo controle. E os grupos SDT, SMT e CLA apresentaram valores significativamente menores ($P<0,05$) de Alto Potencial Mitocondrial (HPM) quando comparados ao controle. Os antibióticos efetivos contra o *N. caninum* e que não foram deletérios aos espermatozoides, e por isso podem ser adicionados aos meios diluidores para criopreservação de sêmen de touros, foram a clindamicina, a claritromicina e o trimetoprim isolado.

Palavras-chave: Neosporose. Bovinos. Sêmen. Antibiótico. Diluente.

ABSTRACT

The knowledge of the transmission pathways and life cycle of *Neospora caninum* is important for an implementation of disease control measures. As *N. caninum* DNA was detected in the fresh and frozen semen of bulls, previous studies evaluated the venereal transmission of *N. caninum* in cattle, classifying it as a horizontal transmission route. For this reason, preventive measures are required for the use of *N. caninum* infected bulls semen. The present study is divided into two chapters: the first chapter is about a literature review on Neosporosis in the bovine species and the second chapter refers to the conduction of experiments 1 and 2 with the objective of developing a diluent for cryopreservation of bull semen that is efficient in the prophylaxis of venereal transmission of *N. caninum*. The experiment 1 corresponds to the antimicrobial test - trimethoprim isolated (TRI) and associated with sulfadiazine (SDT) and sulfamethoxazole (SMT), clarithromycin (CLA), erythromycin (ERI), azithromycin (AZI) and clindamycin (CLI) - was carried out with cell culture inoculated with 10^4 tachyzoites of *N. caninum* which was evaluated for the presence of tachyzoites and the cytopathic effect in the monolayer using inverted microscope. With the results obtained from the test of the active principles and associations in cell culture, the antimicrobials that demonstrate effective in controlling the tachyzoites *in vitro*, were used in the preparation of the diluent for semen. Each diluent medium were evaluated for toxicity to the sperm cells (experiment 2). The collected bovine ejaculate was divided into 8 groups, with 7 groups receiving an antibiotic in the diluent medium for cryopreservation and one not receiving (control group). Sperm kinetics in automated system (*Computer Assisted Sperm Analysis* - CASA), acrosomal reaction and mitochondrial potential performed in flow cytometry in cryopreserved samples. The groups did not differ in relation to the control group regarding the amplitude of lateral head displacement (ALH), straightness (STR) and linearity (LIN) parameters. The SDT, SMT and AZI groups presented lower values ($P < 0.05$) of average path velocity (VAP) in relation to the control group. The straight-line velocity (VSL) was lower in the SMT and AZI groups ($P < 0.05$) and the beat/cross frequency (BCF) was also lower in the CLI and AZI groups ($P < 0.05$). The curvilinear velocity (LCV) values of the SDT, SMT and CLA groups were lower than the control group ($P < 0.05$). In relation to total motility (TM) and progressive motility (PM), the SMT, ERI and AZI groups had lower values ($P < 0.05$) when compared to the control group. Similarly, the SMT and AZI groups showed more morphological defects. As for flow cytometry, the SDT, SMT and AZI groups presented significantly higher ($P < 0.05$) percentages of spermatozoa with reacted acrosome than the control group. And the SDT, SMT and CLA groups presented significantly lower values ($P < 0.05$) of high potential mitochondrial (HPM) when compared to the control group. The antibiotics effective against *N. caninum* and that were not deleterious to spermatozoa and therefore can be added to the diluent media for cryopreservation of bull semen were clindamycin, clarithromycin and trimethoprim.

Key words: Neosporosis. Bovine. Semen. Antibiotic. Diluent.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo biológico do *Neospora caninum* e formas de transmissão nos bovinos. Os hospedeiros intermediários podem se infectar horizontalmente pela ingestão dos oocistos esporulados eliminados nas fezes pelos hospedeiros definitivos, ou verticalmente durante a gestação. A transmissão transplacentária pode ser exógena quando a fêmea prenha ingere oocistos do ambiente e endógena, quando ocorre recrudesência dos taquizoítas que alcançam o feto. Fonte: Adaptado de Benavides et al., 2014.....20
- Figura 2 – Taquizoítas de *Neospora caninum* (setas) na câmara de Neubauer® (400x). FONTE: arquivo.....41
- Figura 3 – Efeito citopático na monocamada de células Vero e taquizoítas livres de *Neospora caninum* (setas) no grupo controle (200x). FONTE: arquivo pessoal.....42
- Figura 4 – Técnica de coleta de sêmen por estimulação manual do pênis no touro (A: massagem na região perineal; B: pressão digital da glândula; C: coleta do ejaculado no momento da propulsão). FONTE: Arquivo pessoal.....44
- Figura 5 – A: Tapete celular íntegro e ausência de taquizoítas livres de *Neospora caninum* no grupo experimental AZI. B: Efeito citopático, presença de taquizoítas livres e taquizoítas intracelulares no grupo controle com 5 dias de cultivo celular (200x). FONTE: Arquivo pessoal.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais de antimicrobianos testados em cultivo celular de <i>Neospora caninum</i> e seus respectivos princípios ativos e concentrações finais.....	43
Tabela 2 – Grupos experimentais de antimicrobianos com seus respectivos princípios ativos utilizados no preparo do diluente para criopreservação de sêmen de touro.....	45
Tabela 3 – Média \pm desvio padrão da MT (motilidade total) (%), MP (motilidade progressiva) (%), Defeitos de acrossoma (%), Defeitos de cauda (%), Espermatozoides com reação acrossomal (%) Espermatozoides com MP lesada (%) e HPM (alto potencial mitocondrial) (%) das amostras descongeladas de sêmen dos grupos experimentais.....	51
Tabela 4 – Média \pm desvio padrão da VAP (velocidade de trajeto) ($\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade progressiva) (m/s), VCL (velocidade curvilinear) ($\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude de deslocamento lateral de cauda) (μm), BCF (frequência de batimento de cauda) (hz), STR (retinearidade) (%) e LIN (linearidade) (%) das amostras descongeladas de sêmen dos grupos experimentais.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cm - centímetros

g – gramas

ng – nanogramas

nm - nanometros

q.s.p – quantidade suficiente para

µg/mL – microgramas por mililitro

µL – microlitros

µm – micrometros

µm/s – micrometros por segundo

mg – miligramas

mL – mililitros

mM – milimolar

mW -

°C – graus Celsius

pH – Potencial hidrogeniônico

ALH – Amplitude de deslocamento lateral de cabeça

BCF – Frequência de batimento de flagelo

CASA – Computer Assisted Sperm Analysis

FITC-PSA – Aglutinina do *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de Fluoresceína

HPM – Potencial mitocondrial

Hz - hertz

H342 – Hoechst 33342

IP – Iodeto de Propídio

LIN – linearidade

MP – Motilidade progressiva

MPAI – Membranas plasmática e acrossomal íntegras

MPIAL – Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada

MPLAI – Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal íntegra

MPAL – Membranas plasmática e acrossomal lesadas

MT – Motilidade total

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RPM – Rotações por minuto
STR - Retinearidade
UI – Unidade Internacional
VAP – Velocidade de trajeto
VCL – Velocidade curvilinear
VSL – Velocidade progressiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	NEOSPOROSE NA ESPÉCIE BOVINA	18
3.1	INTRODUÇÃO	18
3.2	DESENVOLVIMENTO.....	19
3.2.1	Classificação do <i>Neospora caninum</i>	19
3.2.2	Ciclo biológico, hospedeiros e epidemiologia.....	19
3.2.3	Transmissão do <i>Neospora caninum</i>	21
3.2.4	Neosporose no Brasil	22
3.2.5	Mecanismo do abortamento	23
3.2.6	Medidas de controle da doença	25
3.3	CONCLUSÃO.....	27
	REFERÊNCIAS	28
4	PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO DO NEOSPORA CANINUM PELO ..	37
	SÊMEN DE TOUROS	37
4.1	INTRODUÇÃO	39
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.2.1	Experimento 1: Teste <i>in vitro</i> dos princípios ativos e associações	
	eficazes contra <i>Neospora caninum</i>	40
4.2.1.1	Manutenção do cultivo celular e dos taquizoítas de <i>Neospora caninum</i> ..	40
4.2.1.2	Recuperação dos taquizoítas, preparo dos antimicrobianos e teste em	
	cultivo celular.....	40
4.2.1	Experimento 2: Avaliação da viabilidade espermática após diluição	
	em diluente contendo os antimicrobianos eficientes contra <i>Neospora</i>	
	<i>caninum</i>.....	43
4.2.1.1	Coleta do sêmen, descrição da técnica e avaliação espermática	43
4.2.1.2	Preparo do diluente de sêmen com os princípios ativos selecionados a	
	partir do teste em cultivo celular	44
4.2.1.3	Processamento e congelamento do sêmen.....	45

4.2.1.4	Avaliação espermática após descongelação.....	46
4.2.1.5	Morfologia espermática em formol salina	46
4.2.1.5.1	Análise computadorizada da cinética espermática.....	47
4.2.1.5.2	Itometria de fluxo	47
4.2.2	Análise estatística	48
4.2.3	Comitê de ética de uso animal	48
4.3	RESULTADOS	49
4.3.1	Experimento 1: Teste <i>in vitro</i> dos princípios ativos e associações eficazes contra <i>Neospora caninum</i>	49
4.3.2	Experimento 2: Avaliação da viabilidade espermática após diluição em diluente contendo os antimicrobianos	51
4.4	DISCUSSÃO	52
4.5	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	60
	ANEXO 1 - FLUXOGRAMA DA EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS 1 E	73
	ANEXO 2 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.	74

1 INTRODUÇÃO

A principal causa de prejuízo decorrente da neosporose está relacionada à falha reprodutiva nos bovinos, relatada em muitos países (DUBEY; SCHARES, 2011; CAMPERO et al., 2015). Além dos custos diretos envolvidos com a perda fetal, os custos indiretos incluem assistência profissional e gastos associados ao diagnóstico, à diminuição da produção de leite e custos de descarte e reposição de animais (DUBEY; SCHARES, 2006; ORTEGA-MORA et al, 2006).

O custo de cada perda fetal é variável dependendo da idade e da genética do animal. As perdas após o nascimento são difíceis de serem contabilizadas devido a ausência de sinais clínicos, além da falha reprodutiva observada em animais adultos. Vacas soropositivas pertencentes a rebanhos endêmicos apresentam quase o dobro de chances de abortar quando comparadas com vacas soronegativas (Bartels et al., 2006). Em um estudo retrospectivo envolvendo um rebanho de 2.000 vacas de leite com histórico de abortamento associado a neosporose, as vacas soropositivas apresentam 1,6 vezes mais chances de serem descartadas mais precocemente que as vacas soronegativas (THURMOND; HIETALA, 1996).

Vacas soropositivas produzem aproximadamente 1kg a menos de leite por dia (THURMOND; HIETALA, 1997). De acordo com Hernandez et al. (2001), estima-se que a neosporose causa diminuição de 3 a 4% na produção de leite, gerando perdas de US\$ 128 por lactação por vaca. Romero et al. (2005) reportaram que vacas soronegativas produzem 84,7 litros de leite a mais em uma lactação quando comparadas com animais soropositivos. Em bovinos de corte, os efeitos sobre o descarte precoce, o peso de desmame, o ganho de peso médio diário durante o confinamento e o desempenho reprodutivo também foram estimados (WALDNER et al., 1998; LARSON et al., 2004).

Vários estudos calcularam as perdas econômicas envolvendo bovinos de corte (LARSON et al., 2004) e de leite (BARTELS et al., 2006; CHI et al., 2002; HASLER et al., 2006a; 2006b; REICHEL; ELLIS, 2006). Reichel et al. (2013) relatam perdas anuais que ultrapassam 1 bilhão de dólares em decorrência das falhas reprodutivas em todo o mundo. Estima-se que, na Califórnia, a perda econômica seja em torno de US\$ 35 milhões por ano devido ao abortamento associado ao *Neospora caninum* (BARR et al., 1994). Na Austrália e Nova Zelândia, as perdas

anuais são superiores a US\$ 100 milhões (REICHEL, 2000). Na Suíça, as perdas econômicas envolvendo gado leiteiro foram estimadas em 9,7 euros por ano (HASLER et al., 2006a; 2006b), sendo a neosporose considerada uma doença notificável desde 2001 (HASLER et al., 2006b). A perda anual também foi estabelecida no Canadá, e Chi et al. (2002) estimam ser em torno de US \$ 2.304. Na Holanda, 76% dos rebanhos soropositivos sem episódios de aborto não apresentaram perdas econômicas, enquanto nos 24% restantes, as perdas econômicas aumentaram notavelmente (BARTELS et al., 2006).

Medidas de controle da neosporose em bovinos então sendo implantadas em diferentes países (CONRATHS; ORTEGA-MORA, 2005; DIJKSTRA et al., 2005; HADDAD et al., 2005; HALL et al., 2005; ORTEGA-MORA et al., 2006) em decorrência do impacto econômico gerado nos rebanhos pelas falhas reprodutivas. Devido aos diferentes fatores de risco envolvendo a transmissão da neosporose e a ocorrência do abortamento nas vacas de leite e de corte criadas em diferentes regiões e sob diferentes condições de manejo, as estratégias de controle devem levar em consideração as características referentes ao rebanho, sistema de manejo, prevalência da doença, via de transmissão predominante e consequências geradas no desempenho reprodutivo e produtivo dos animais (DUBEY et al., 2007). Em propriedades onde o aborto está associado à transmissão endógena do *N. caninum*, o controle deve concentrar-se na identificação de animais infectados, para posterior descarte (TREES; WILLIAMS, 2000). Como o DNA de *N. caninum* foi detectado no sêmen fresco e congelado de touros (ORTEGA-MORA et al., 2003; SILVA et al., 2004; FERRE et al., 2005; SHARIFZADEH et al., 2012), estudos avaliaram a transmissão venérea deste protozoário em bovinos, classificando-a como via de transmissão horizontal (SERRANO et al., 2006; Serrano-Martinez et al., 2007). Além disso, não existem até o momento estudos sobre a profilaxia da transmissão venérea do *N. caninum*. Desta forma, é necessário desenvolver um trabalho com objetivo de estabelecer uma forma de precaução para o uso do sêmen de touros infectados com *N. caninum*.

O presente estudo está dividido em dois capítulos: capítulo I com a revisão de literatura sobre “Neosporose na espécie bovina”, e o capítulo II com o título “Profilaxia da transmissão de *Neospora caninum* pelo sêmen de touros” composto por dois experimentos (Experimento 1: Teste *in vitro* dos princípios ativos e

associações contra *Neospora caninum* e Experimento 2: Avaliação da viabilidade espermática após diluição em diluente contendo os antimicrobianos eficientes no controle do *N. caninum*).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um diluente, para criopreservação de sêmen de touro, eficiente na profilaxia da transmissão venérea do *Neospora caninum*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a dose de diferentes princípios ativos e associações eficazes contra *Neospora caninum* em cultivo celular, visando a composição de diluentes para criopreservação do sêmen bovino;
- Avaliar a viabilidade espermática após diluição e congelamento do sêmen em meio diluidor contendo os antimicrobianos estabelecidos anteriormente.

3 NEOSPOROSE NA ESPÉCIE BOVINA

(*Neosporosis in cattle*)

RESUMO

O *Neospora caninum* é o agente etiológico da neosporose e em 1989 foi identificado como causador de perdas fetais em bovinos. Atualmente, o *N. caninum* é responsável por grande impacto no setor agropecuário devido a problemas reprodutivos nos rebanhos, sendo a neosporose, uma das principais causas de abortamento em bovinos. Nessa revisão são apresentadas as formas de transmissão do *N. caninum*, incluindo a potencialidade da transmissão venérea assim como as medidas de prevenção que atualmente são propostas com o objetivo de reduzir a contaminação dos animais. Além disso, faz referências a estudos recentes envolvendo o impacto da neosporose na bovinocultura mundial.

Palavras-chave: neosporose, transmissão venérea, profilaxia

ABSTRACT

Neospora caninum is the etiological agent of neosporosis and in 1989 it was identified as cause of fetal losses in cattle. Currently, the *N. caninum* is responsible for a great impact in the agricultural sector due to reproductive problems in the herds. A neosporosis is one of the main causes of abortion in cattle. In this review they are presented as ways of transmission of *N. caninum*, including a potential of venereal transmission as prevention and consumption measures are recommended with the aim to reduce the contamination of the animals. In addition, it makes references to recent studies involving the impact of neosporosis on global cattle breeding.

Key words: neosporosis, venereal transmission, prophylaxis

3.1 INTRODUÇÃO

A neosporose, causada pelo protozoário *Neospora caninum*, foi associada ao aborto primeiramente em 1987 em vacas de leite no México e, posteriormente, muitos estudos confirmaram essa infecção como uma causa significativa de abortamento na espécie bovina (ANDERSON et al., 1991; THORNTON et al., 1991; NIETFELD et al., 1992; THORNTON et al., 1994; DUBEY; LINDSAY, 1996; CAMPERO et al., 1998; FONDEVILA et al., 1998; GOTTSTEIN et al., 1998; SCHARES et al., 1998). Reichel et al. (2013) relatam que as perdas anuais envolvendo a neosporose nos bovinos ultrapassam 1 bilhão de dólares em decorrência das falhas reprodutivas em todo o mundo. Esses custos globais foram estimados em US\$ 852,4 milhões na América do Norte (EUA, Canadá e México), US\$ 239,7 milhões na América do Sul (Brasil, Argentina), US\$ 137,5 milhões na

Oceania (Austrália, Nova Zelândia) e US\$ 68,7 milhões na Europa (Holanda, Espanha, Reino Unido).

3.2 DESENVOLVIMENTO

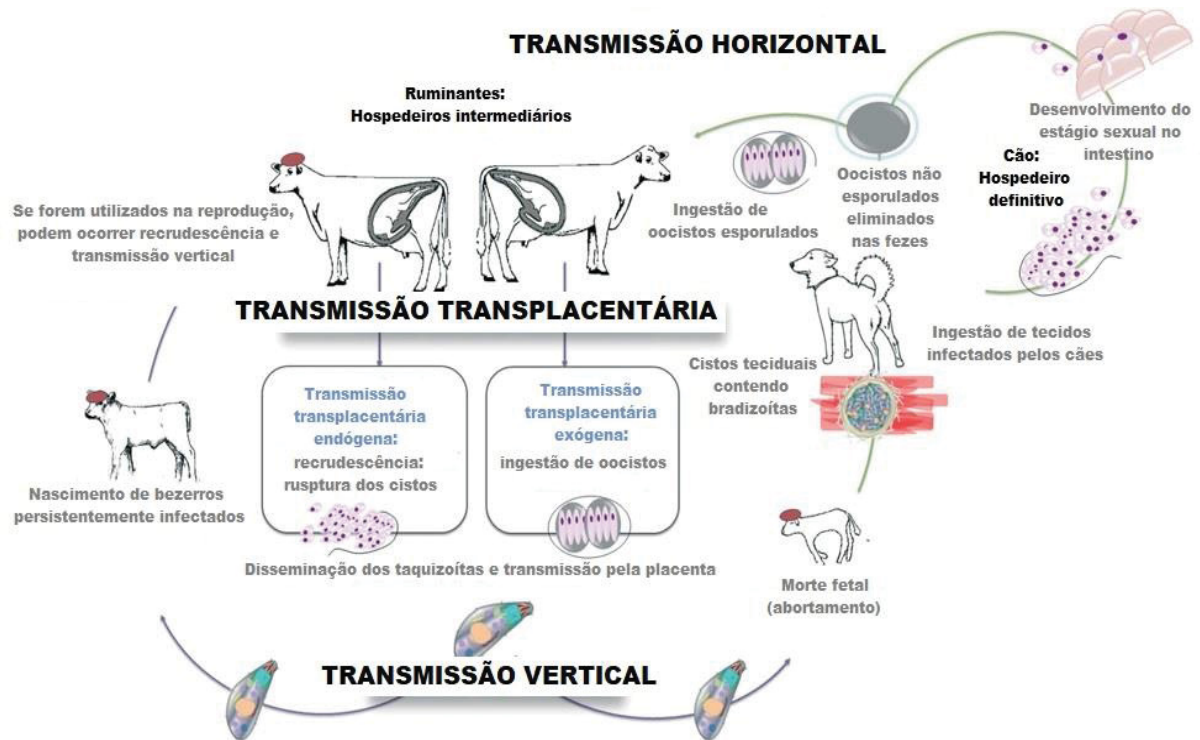
3.2.1 Classificação do *Neospora caninum*

O *Neospora caninum* é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe *Sporozoea*, ordem *Eucoccidiida* e família *Sarcocystidae* (DUBEY et al., 1988). Esse protozoário foi caracterizado primeiramente como agente causador de doença em cães em 1984 (BJERKAS et al., 1984) e, posteriormente, em bezerros em 1987 (OTOOLE; JEFFREY, 1987; PARISH et al., 1987). Foi isolado em 1988 a partir de cães com sinais neurológicos, sendo então classificado como um novo gênero e espécie (DUBEY et al., 1988). Em 1989 foi identificado como responsável por perdas fetais em bovinos (THILSTED; DUBEY, 1989). Atualmente, o *N.caninum* é reconhecido mundialmente como causador de neosporose, principal causa de abortamento na espécie bovina (DUBEY et al., 2007).

3.2.2 Ciclo biológico, hospedeiros e epidemiologia

O ciclo biológico do *Neospora caninum* (Figura 1) é heteroxeno e compreende três estágios infectantes. Dois deles, os taquizoítas e os bradizoítas, são estágios intracelulares e ocorrem nos hospedeiros intermediários e definitivos. Já o terceiro é caracterizado pelos oocistos, que são eliminados nas fezes pelos hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 1988; MCALLISTER et al., 1998; DUBEY, 2003). Apesar de a neosporose ser considerada uma doença de grande importância para as espécies bovina e canina, o *N. caninum* apresenta uma variedade de hospedeiros (DUBEY et al., 2007; DUBEY; SCHARES, 2011). Os hospedeiros definitivos são os cães domésticos e alguns canídeos selvagens, como coiotes, dingos e lobos-cinzentos (MCALLISTER, 1998). Os bovinos e outros animais de sangue quente atuam como hospedeiros intermediários (Dubey e Lindsay, 1996; Huang et al., 2004).

Figura 1 - Ciclo biológico do *Neospora caninum* e formas de transmissão nos bovinos. Os hospedeiros intermediários podem se infectar horizontalmente pela ingestão dos oocistos esporulados eliminados nas fezes pelos hospedeiros definitivos, ou verticalmente durante a gestação. A transmissão transplacentária pode ser exógena quando a fêmea prenha ingere oocistos do ambiente e endógena, quando ocorre recrudescência dos taquizoítas que alcançam o feto.



Fonte: Adaptado de Benavides et al., 2014.

Os bradizoítas presentes nos cistos teciduais, quando ingeridos pelos canídeos, sofrem diferenciação sexual na mucosa intestinal, transformando-se em oocistos não esporulados que são eliminados nas fezes (DUBEY et al., 2002). No ambiente, a esporulação dos oocistos ocorre entre 24 e 72 horas, dependendo das condições climáticas (LINDSAY et al., 1999; GONDIM et al., 2002). Esses oocistos esporulados contendo esporozoítos são ingeridos pelos hospedeiros intermediários e liberados no trato intestinal, penetrando nas células e transformando-se em taquizoítas (LINDSAY et al., 1999). Nos hospedeiros intermediários, os taquizoítas se multiplicam assexuadamente, e devido à resposta imunológica desses animais, podem se diferenciar em bradizoítas formando os cistos teciduais (PETERS et al., 2001). Esses cistos são encontrados no sistema nervoso central e nos músculos (PETERS et al., 2001), e podem persistir por toda a vida, resultando em manifestações clínicas (DUBEY; LINDSAY, 1996). O ciclo de vida se completa quando os cistos são ingeridos pelos canídeos (MCALLISTER et al., 1998).

Existem evidências de que a epidemiologia da neosporose varia em relação ao gado de leite e ao gado de corte. Essa diferença pode ser atribuída a forma como esses animais são criados. Já foi demonstrado que quando o rebanho é criado intensivamente está sujeito ao aumento da soroprevalência do *N. caninum* (SANDERSON et al., 2000; OTRANTO et al., 2003). Muitos estudos têm demonstrado a menor prevalência da infecção em bovinos de corte quando comparada aos bovinos leiteiros (QUINTANILLA-GOZALO et al., 2000; MOORE et al., 2002; BARTELS et al., 2006; DUBEY et al., 2007). Assim como, De Meerschman et al. (2000) relatam que vacas de corte infectadas apresentam menor risco de abortamento em relação às vacas de leite soropositivas.

3.2.3 Transmissão do *Neospora caninum*

O *Neospora caninum* pode ser transmitido para os bovinos por meio da transmissão horizontal ou da transmissão vertical transplacentária durante a gestação (BENAVIDES et al., 2014). A transmissão horizontal ocorre pela ingestão de oocistos esporulados (DUBEY et al., 2007). Muitos estudos epidemiológicos encontraram uma associação entre a soroprevalência e a presença de cães no ambiente, sugerindo que esses animais podem contribuir com a disseminação da neosporose para os bovinos (PARE et al., 1998; BARTELS et al., 1999; WOUUDA et al., 1999; ABREU et al., 2014). A transmissão vertical transplacentária pode ser classificada em exógena ou endógena. A transmissão exógena ocorre quando a fêmea prenha adquire a infecção após a ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos, e posteriormente, os parasitas infectam os tecidos do feto. Já a transmissão endógena é devido a recrudescência dos bradizoítas pela ruptura dos cistos teciduais nas fêmeas persistentemente infectadas durante a gestação, com consequente disseminação dos taquizoítas, resultando em infecção fetal (TREES; WILLIAMS, 2005; BENAVIDES et al 2014).

Em rebanhos endêmicos, a maioria dos bezerros nascidos de vacas soropositivas apresenta sorologia após o nascimento, sendo a taxa de soropositividade similar entre bezerros e animais adultos. Esses bezerros infectados pela via congênita tornam-se persistentemente infectados (WILLIAMS et al., 2000; DUBEY et al., 2006; COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2006; ROSBOTTOM et al.,

2007). Desta forma, a transmissão da neosporose pelas gerações de bovinos parece ser a principal forma de manutenção da infecção no rebanho (PARE et al., 1994; BJORKMAN et al. 1997; ANDERSON et al., 1997; THURMOND et al., 1997; SCHARES et al., 1998; WOUDA et al., 1998).

As vias lactogênica e venérea são outras formas possíveis de transmissão da neosporose. O DNA do *N. caninum* foi detectado no colostro (Moskwa et al., 2007) e a sua transmissão foi demonstrada experimentalmente (UGGLA et al., 1998; DAVISON et al., 2001). No entanto, a transmissão lactogênica do *N. caninum* ainda não foi relatada em condições naturais (DIJKSTRA et al. 2001a, b).

O DNA de *N. caninum* também foi detectado no sêmen fresco e congelado de touros utilizando a técnica de PCR (ORTEGA-MORA et al., 2003; SILVA et al., 2004; FERRE et al., 2005; SERRANO-MARTINEZ et al., 2007a; SHARIFZADEH et al., 2012; DOOSTI et al., 2015). Serrano et al. (2006) demonstraram que novilhas inseminadas com sêmen contaminado com 10^7 taquizoítas do *N. caninum* apresentaram soroconversão. E a taxa de prenhez do grupo inseminado com sêmen infectado foi inferior (11,1%) ao grupo controle (66,6%), indicando que a transmissão horizontal através do sêmen é possível. Ademais, Serrano-Martinez et al. (2007b) estudaram o potencial da transmissão venérea utilizando sêmen contaminado com quantidades diferentes de taquizoítas do *N. caninum*, 0; 10^2 ; 5×10^3 ; 5×10^4 e 5×10^5 , para inseminação artificial de cinco grupos de fêmeas incluindo vacas e novilhas. Os resultados obtidos indicaram que a infecção intrauterina por sêmen contaminado causou respostas de anticorpos específicos contra o parasita em algumas fêmeas. Além disso, a taxa de prenhez foi menor nos grupos inseminados com sêmen contaminando com as maiores concentrações de neospora, indicando que o *N. caninum* é uma provável causa de morte fetal precoce em novilhas inoculadas.

3.2.4 Neosporose no Brasil

A neosporose é uma importante causa de problemas reprodutivos, acarretando perdas econômicas significativas no setor agropecuário e muitos estudos têm demonstrado que é uma doença prevalente no Brasil. De acordo com Favero et al. (2017), mais 30,9% das vacas de rebanhos localizados em Santa Catarina apresentam títulos de anticorpos contra *N. caninum*. No entanto, essa

soroprevalência é a mais alta quando comparada a outros estados do sul do país, bem como a outras regiões do Brasil com características geográficas diferentes. No Paraná, a prevalência foi de 15,1% em vacas de leite e 7,7% em bovinos de corte (GUIMARÃES et al., 2004). A doença também é considerada prevalente (91,2%) em vacas de leite em Minas Gerais (GUEDES et al., 2008). Para Dubey e Shares (2011), a prevalência da neosporose difere entre países, dentro de uma mesma região e também entre rebanhos de corte e de leite. Isso pode ser decorrente da forma como os animais são criados (MOORE, 2005).

No Brasil, existem estudos relatando o isolamento do parasito a partir de amostras de feto bovino (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2003; 2004), de bezerro (GARCIA-MELO et al., 2009) e de bovino adulto (OLIVEIRA et al., 2017), nos estados do Paraná, Goiás e São Paulo, respectivamente. Carvalho-Patricio et al. (2013) detectaram DNA de *N. caninum* em cérebro de bovinos adultos com sinais neurológicos pertencentes a diferentes rebanhos do Paraná, demonstrando a ampla distribuição do parasito. Em um trabalho recente, foi feito isolamento e caracterização molecular de *N. caninum* a partir de rim e cérebro de um feto bovino de 4 meses de idade (LOCATELLI-DITTRICH et al., 2018).

3.2.5 Mecanismo do abortamento

Dubey et al. (2007) afirmam que vacas de qualquer idade podem abortar a partir dos 3 meses de gestação, sendo que a maioria ocorre entre os 5 e 7 meses. O risco é significativamente maior quando a contaminação da fêmea ocorre durante o segundo terço da gestação (LÓPEZ-GATIUS et al., 2004). A infecção durante o primeiro trimestre de gestação está geralmente associada à colonização da placenta pelo *N. caninum* e ao desenvolvimento de lesões inflamatórias e áreas de necrose, com subsequente morte, seguida de reabsorção embrionária, autólise ou mumificação fetal (DUBEY et al., 1992; WILLIAMS et al., 2000; MACALDOWIE et al., 2004; ROJO-MONTEJO et al., 2009). No entanto, a infecção de vacas nesse estágio de prenhez nem sempre resulta em morte fetal e essas fêmeas podem gerar bezerros aparentemente normais, mas que apresentam sorologia positiva e evidências da infecção (WILLIAMS et al., 2000; GONDIM et al., 2004; MACALDOWIE et al., 2004; MCCANN et al., 2007; CASPE et al., 2012).

O fato da infecção durante o primeiro trimestre da gestação resultar em morte fetal ou ausência completa de sinais clínicos foi descrito como uma resposta “all or nothing” (BENAVIDES et al., 2014), visto que a produção de citocinas e a lesão direta do feto pela multiplicação dos taquizoítos podem determinar a sobrevivência ou a morte fetal (INNES, 2007; ROSBOTTOM et al., 2008, 2011; ALMERÍA et al., 2010). O risco de abortamento na segunda prenhez foi considerado menor por Thurmond e Hietala, (1997). No entanto, de acordo com Dubey e Lindsay (1996) na maioria dos casos, as vacas que abortam um feto em decorrência da neosporose terão abortos adicionais ou fetos infectados em gestações subsequentes.

A resposta imune do feto desempenha um papel importante no desenvolvimento da infecção. De acordo com Bartley et al. (2012), a resposta imune específica do feto contra *N. caninum* foi encontrada a partir do 100º dia de gestação. Em um estudo feito por Benavides et al. (2012), quando as vacas foram infectadas no dia 210 da gestação, não houve abortamento e também não foram observadas lesões nos bezerros, sugerindo um controle da infecção pelas respostas imunes maternas e fetais.

Após a parasitemia materna desencadeada por uma infecção exógena ou após recrudescência de uma infecção endógena durante a gestação (DUBEY et al., 2007), o *N. caninum* se estabelece nas carúnculas antes de atravessar a vilosidade placentária fetal. Para que o aborto ocorra, o feto ou a placenta devem ser danificados (GIBNEY et al., 2008), induzindo a liberação de prostaglandinas maternas que, por sua vez, causam luteólise e aborto. O dano fetal pode ocorrer devido à multiplicação de *N. caninum* nos tecidos do feto (GIBNEY et al., 2008) ou ainda devido à insuficiência de oxigênio e à nutrição em decorrência das lesões placentárias (DUBEY et al., 2006; INNES, 2007; LOPEZ-GATIUS et al., 2007, GIBNEY et al., 2008; ALMERÍA et al., 2010).

De acordo com Monney e Hemphill (2014), existem diferentes padrões de aborto associado ao *Neospora caninum*: epidêmico e endêmico. O padrão epidêmico é definido por surtos temporários de aborto (DAVISON et al., 1999), sendo decorrente da infecção primária de fêmeas não infectadas expostas ao mesmo tempo a uma fonte comum de contaminação (MCALLISTER et al., 2000). No padrão endêmico, os abortos ocorrem de forma intermitente durante meses ou anos

e são decorrentes de fêmeas persistentemente infectadas que transmitem o parasita para sua progênie (HALL et al., 2005).

Uma manifestação incomum da infecção fetal por *N. caninum* é o nascimento a termo de bezerros com anormalidades envolvendo o sistema nervoso. Esses sinais neurológicos são manifestados desde defeitos proprioceptivos até uma paralisia completa. (DUBEY; LINDSAY, 1996). Além do aborto e da infecção congênita, as perdas econômicas são também decorrentes do aumento no intervalo entre partos, da redução na produção de leite e das taxas elevadas de descarte de animais com baixa eficiência reprodutiva (THURMOND; HIETALA, 1997; TREES et al., 1999; BARTELS et al., 2006).

3.2.6 Medidas de controle da doença

O conhecimento da epidemiologia e do ciclo de vida do *Neospora caninum* é essencial para o desenvolvimento e implementação de estratégias de controle da doença. Essas medidas foram propostas por Reichel e Ellis (2006); Dubey et al. (2007); Eiras et al. (2011) e Guido et al. (2016) e incluem: abate e substituição de animais soropositivos, técnicas de manejo, inseminação artificial de fêmeas soropositivas com sêmen de touros zebuínos e transferência de embrião. Estudos estão sendo direcionados para a produção de vacinas contra o parasita para uso em animais de produção (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2009; ROJO-MONTEJO et al., 2011; WEBER et al., 2013; HECKER et al., 2013) e em cães (MCALLISTER et al., 2016), uma vez que esses animais são responsáveis por contribuir com a disseminação da doença para os bovinos. No entanto, até o presente momento, as vacinas não são eficazes.

Em rebanhos bovinos infectados por *N. caninum*, os programas de controle são baseados na prevenção da transmissão vertical pela eliminação de animais soropositivos e diminuição da transmissão horizontal de *N. caninum*, principalmente, pelo impedimento do acesso dos hospedeiros definitivos, que são fontes de contaminação pois eliminam oocistos nas fezes (DUBEY et al., 2007), às áreas de pastagens dos bovinos. As medidas de manejo como remoção de tecidos potencialmente infectados do ambiente, tais como fetos abortados e placenta, que

podem servir como fonte de infecção para os hospedeiros susceptíveis são recomendadas (ANDERSON et al., 2000).

Apesar de não impedir a transmissão transplacentária endógena de *N. caninum* ao feto, o uso de sêmen infectado de touros de raças de corte na inseminação de vacas de leite soropositivas levou a menores taxas de aborto quando comparado ao uso de sêmen de touros leiteiros infectados (LOPEZ-GATIUS et al., 2005; ALMERÍA et al., 2009). Almería et al. (2009) relatam que as taxas de aborto foram 32,2% e 15,2% para vacas soropositivas inseminadas com sêmen de touros de raça Holstein-Frisian e de raça de corte, respectivamente. A menor taxa de aborto pode decorrer do efeito favorável do cruzamento na função de proteção placentária, devido a maior concentração de glicoproteínas associadas à gestação (PAG).

A transferência de embriões provenientes de doadoras soropositivas para receptoras soronegativas tem sido sugerida como uma alternativa para prevenir a transmissão transplacentária endógena de *N. caninum* (BAILLARGEON et al., 2001; CAMPERO et al., 2003). De acordo com Bielanski et al. (2002), os embriões de pré-implantação com a zona pelúcida intacta estão protegidos da invasão de *N. caninum* e podem ser transferidos, desde que sejam processados de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Recomenda-se que as receptoras sejam testadas antes da transferência (PAZ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010), uma vez que a infecção congênita e o abortamento podem ocorrer em receptoras soropositivas (OLIVEIRA et al., 2010).

Além disso, acredita-se que a transmissão venérea de *N. caninum* pode repercutir no comércio de sêmen de touros, uma vez que a inseminação artificial é uma biotecnologia reprodutiva e milhões de doses de sêmen são comercializadas em todo o mundo (PHILPOTT, 1993). Embora a detecção de *N. caninum* no sêmen não implique necessariamente na presença de estágios infecciosos do parasita, os resultados indicam a necessidade de medidas de controle e prevenção para o uso do sêmen de touros infectados.

Uma vez que as medidas de controle sejam implementadas, é essencial monitorar o status do rebanho e evitar a reintrodução da doença. Medidas de monitoramento podem incluir testar periodicamente um número representativo de animais, por meio de sorologia individual ou monitorar o leite em massa para a

presença de anticorpos específicos contra *N. caninum* em rebanhos leiteiros. Como as vacas e as novilhas de reposição representam risco de reintrodução da doença, esses animais devem ser adquiridos de propriedades livres de *N. caninum* (GUIDO et al., 2016).

3.3 CONCLUSÃO

Apesar de atualmente muitos estudos serem direcionados a tentativas de controle e prevenção da neosporose nos rebanhos, a doença ainda é responsável por um grande impacto econômico na pecuária. Até o momento não existe uma medida que seja efetiva no controle do *Neospora caninum*, mas acredita-se que a associação entre diversas medidas possa melhorar de alguma forma a transmissão da doença entre os animais.

REFERÊNCIAS

- ABREU, R.A.; WEISS, R.R.; THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Association of antibodies against *Neospora caninum* in mares with reproductive problems and presence of seropositive dogs as a risk factor. **Veterinary Parasitology**, v.28, p.128-131, 2014.
- AGUADO-MARTÍNEZ, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A. et al. Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice. **Vaccine**, v.27, p.7331–7338, 2009.
- ALMERÍA, S.; LOPEZ-GATIUS, F.; GARCIA-ISPIERTO, I. et al. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.323–329, 2009.
- ALMERÍA, S.; ARAUJO, R.; TUO, W. et al. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.304–311, 2010.
- ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; BARR, B.C. et al. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.198, p.241–244, 1991.
- ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D. et al. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.210, p.1169–1172, 1997.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.417–31, 2000.
- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARE, J. et al. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.218, p.1803–1806, 2001.
- BARR, B.C.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W. et al. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **Journal Veterinary Diagn. Invest.** v.6, p.207–215, 1994.
- BARTELS, C.J.M.; WOUDE, W.; SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands 1995 to 1997. **Theriogenology**, v.52, p.247–257, 1999.
- BARTELS, C.J.; ARNAIZ-SECO, J.I.; RUIZ-SANTA-QUITERA, A. et al. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.17–27, 2006.

- BARTLEY, P.M.M.; WRIGHT, S.E.M.; MALEY S.W.D. et al. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. **Veterinary Research**, 43: 38, 2012.
- BENAVIDES, J.; KATZER, F.; MALEY, S.W. et al. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. **Veterinary Research**, 43, 83, 2012.
- BENAVIDES, J.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; FERRE, I. et al. Experimental ruminant models for bovine neosporosis: what is know and what is needed. **Parasitology**, v.141, p.1471–1488, 2014.
- BJERKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift Fur Parasitenkunde**, v.70, p.271–274, 1984.
- BJORKMAN, C.; HOLMDAHL, O.J.; UGGLA, A. An indirect enzyme-linked immunoassay ELISA. For demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.68, p.251–260, 1997.
- BIELANSKI, A.; ROBINSON, J.; PHIPPS-TODD, B. Effect of *Neospora caninum* on in vitro development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. **Veterinary Record**, v.150, p.316–318, 2002.
- CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.62, p.1329–1336, 2004.
- CAMPERO, C.M.; ANDERSON, M.L.; CONOSCIUTO, G. et al. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. **Veterinary Record**, v.143, p.228–229, 1998.
- CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; LAGOMARSINO, H. et al. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum* seropositive cows. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.50, p.458–60, 2003.
- CAMPERO, L.M.; VENTURINI, M.C.; MOORE, D.P. et al. Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. **Exp. Parasitol.** v.155, p.8-12, 2015.
- CARVALH-PATRÍCIO, M.A.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E. et al. *Neospora* e DNA prevalence in rabies-negative cattle with neurological disorders. **Vet. Rec.** 172, 238, 2013.
- CASPE, S.G.; MOORE, D.P.; LEUNDA, M.R. et al. The *Neosporacanium*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. **Veterinary Parasitology**, v.189, p.171–181, 2012.

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; ARNAIZ-SECO, I. et al. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. **Theriogenology**, v.65, p.629–641, 2006.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. **International Journal Parasitology**, v.29, p.1683–1689, 1999.

DAVISON, H.C.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W. et al. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.163–168, 2001.

DE OLIVEIRA, V.S.F.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L.M. et al. Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in an embryo transfer center. **Veterinary Parasitology**, v.173, p.206–210, 2010.

DE MEERSCHMAN, F.; FOCANT, C.; BOREUX, R. et al. Cattle neosporosis in Belgium: a case-control study in dairy and beef cattle. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.887–890, 2000.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M. et al. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.209–215, 2001a.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G. et al. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.747–752, 2001b.

DOOSTI, A.; KHAMESIPOUR, F.; NEKOEI, S. et al. Survey for the presence of *Neospora caninum* on frozen bull's semen samples by PCR assay. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.5, n.1, p.7–12, 2015.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.192, p.1269–1285, 1988.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ANDERSON, M.L. et al. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.201, p.709–713, 1992.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.1–59, 1996.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.929–946, 2002.

DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle. **Journal of Parasitology**, v.89, p.42–56, 2003.

DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, p.267–289, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Review**, v.20, p.323–367, 2007.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.90–108, 2011.

EIRAS, C.; ARNAIZ, I.; ALVAREZ-GARCIA, G. et al. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. **Preventive Veterinary Medicine**, V.98, p.128–132, 2011.

FAVERO, J.F.; DA SILVA, A.S.; CAMPIGOTTO, G. et al. Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. *Microbial Pathogenesis*, p. 1-22, 2017.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I. et al. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, p.1504-1518, 2005.

FONDEVILA, D.; ANOR, S.; PUMAROLA, M. et al. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.77, p.187–189, 1998.

GARCÍA-MELO, D.P.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L.M. et al. Isolation of *N. caninum* from asymptomatic calf in Brazil. *Acta Parasitol.* v.54, p.180-185, 2009.

GIBNEY, E.H.; KIPAR, A.; ROSBOTTOM, A. et al. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **Internacional Journal for Parasitology**, v.38, p.579–588, 2008.

GONDIM, L.F.P.; GAO, L.; MCALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v.88, n.6, p.1159-1163, 2002.

GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.159-161, 2004.

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R. et al. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **Internacional Journal for Parasitology**, v.28, p.679–691, 1998.

GUEDES, M.H.P.; GUIMARÃES, A.M.; ROCHA, C.M.B.M. et al. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas e fetos provenientes de municípios do sul de Minas Gerais, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p.189–194, 2008.

GUIDO, S.; KATZER, F.; NANJIANI, I. et al. Serology-based diagnosis for the control of bovine neosporosis. **Trends in Parasitology**, v.32, n.2, p.131-143, 2016.

GUIMARÃES, J.S.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.1-8, 2004.

HALL, C.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.231-41, 2005.

HECKER, Y.P.; MOORE, D.P.; QUATTROCCHI, V. et al. Immune response and protection provided by live tachyzoites and native antigens from the NC-6 Argentina strain of *Neospora caninum* in pregnant heifers. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.436-446, 2013.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y. et al. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v. 35, p.283-290, 2004.

INNES, E.A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.134, p.1903-1910, 2007.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.327-33, 1999.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.; JOINEAU, M.E. et al. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. **Vet. Rec.** v.153, p.366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B. et al. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.103-109, 2004.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L.M. et al. Isolation of *Neospora caninum* from kidney and brain of a bovine foetus and molecular characterization in Brazil. **Experimental Parasitology**, v.185, p.10-16, 2018.

LOPEZ-GATIUS, F.; LOPEZ-BEJAR, M.; MURUGAVEL, K. et al. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. **Journal of Veterinary Medicine Serie B**, v.51, p.348-352, 2004.

LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J.L. et al. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora* seropositive dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine Serie B**, v.52, p.88-92, 2005.

LOPEZ-GATIUS, F.; ALMERIA, S.; DONOFRIO, G. et al. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Theriogenology**, v.68, p.1067–1073, 2007.

MACALDOWIE, C.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S. et al. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, v.131, p.142–156, 2004.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28, p.1473–1478, 1998.

MCALLISTER, M.M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R. et al. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.217, p.881–887, 2000.

MCALLISTER, M.M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinical Food Animal**, v.32, p.443–463, 2016.

MCCANN, C.M.; MCALLISTER, M.M.; GONDIM, L.F.P. et al. *Neospora caninum* in cattle: experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. **Internation Journal of Parasitology**, v.37, p.1631–1639, 2007.

MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**, v.140, p.52–70, 2014.

MOORE, D.P.; CAMPERO, C.M.; ODEON, A.C. et al. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.107, p.303–316, 2002.

MOORE, D.P. Neosporosis in South America, **Veterinary Parasitology**, v.127, p.87–97, 2005.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J. et al. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v.100, p.633–636, 2007.

NIETFELD, J.C.; DUBEY, J.P.; ANDERSON, M.L. et al. *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.223–226, 1992.

OLIVEIRA, S.; SOARES, R.M.; AIZAWA, J. et al. Isolation and biological and molecular characterization of *Neospora caninum* (NC-SP1) from a naturally infected adult asymptomatic cattle (*Bos taurus*) in the state of São Paulo, Brazil.

Parasitology, v.11, p.1–5, 2017.

ORTEGA-MORA, L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I. et al. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.301–308, 2003.

O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **Veterinary Record** v.121, p.563–566, 1987.

OTRANTO, D.; LLAZARI, A.; TESTINI, G. et al. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.7-18, 2003.

PARE, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M. et al. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.213, p.1595–1598, 1998.

PARE, J.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Congenital *Neospora* infection in dairy cattle. **Veteinary Recprd**, v.134, p.531–532, 1994.

PARISH, S.M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T.E. et al. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.191, p.1599–1600, 1987.

PAZ, G.F.; LEITE, R.C.; ROCHA, M.A. Associação entre sorologia para *Neospora caninum* e taxa de prenhez em vacas receptoras de embriões. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p.1323–1325, 2007.

PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R. et al. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal of Parasitology**, v.31, p.1144–1148, 2001.

PHILPOTT M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **Brazilian Veterinary Journal**, v.149, n.4, p.339-369, 1993.

QUINTANILLA-GOZALO, A.; PEREIRA-BUENO, J.; SEIJAS-CARBALLEDO, A. et al. Observational studies on *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.900–906, 2000.

REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? **Veterinary Parasitology**, v.142, p.23–34, 2006.

REICHEL, M.P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA, M.; GONDIM, L.F. et al. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion dollar question. **Internation Journal for Parasitology**, v.43, p.133–142, 2013.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; BLANCO-MURCIA, J. et al. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. **Veterinary Research**, 40: 49, 2009.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J. et al. Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by na inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.220–229, 2011.

ROSBOTTOM, A.; GUY, C.S.; GIBNEY, E.H. et al. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, v.29, p.219–228, 2007.

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, E.H.; GUY, C.S. et al. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. **Infection and Immunity**, v.76, p.2352–2361, 2008.

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, H.; KAISER, P. et al. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **PLoS ONE** 6, e15799–e15800, 2011.

SANDERSON, M.W.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.15–24, 2000.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R. et al. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.87–98, 1998.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K. et al. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3–4, p. 197–203, 2006.
SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; MARTINEZ, A. et al. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v.67, p.1175–1184, 2007a.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K. et al. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v.67, p.729–737, 2007b.

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P.G. PCR assay for detection of *Neospora caninum* in fresh and frozen semen specimens of Iranian bulls. **World Applied Science Journal**, v.17, n.6, p.742–749, 2012.

THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.205–209, 1989.

THORNTON, R.N.; GAJADHAR, A.; EVANS, J. *Neospora* abortion epidemic in a dairy herd. **New Zealand Veterinary Journal**, v.42, p.190–191, 1994.

THORNTON, R.N.; THOMPSON, E.J.; DUBEY, J.P. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v.39, p.129–133, 1991.

THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal Veterinary Research**, v.58, p.1381–1385, 1997.

TREES, A.J.; DAVISON, H.C.; INNES, E.A. et al. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal of Parasitology**, v.29, p.1195–1200, 1999.

TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J.L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, **Trends in Parasitology**, v.21, p.558-561, 2005.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O.J.M. et al. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1467–72, 1998.

WEBER, F.H.; JACKSON, J.A.; SOBECKI, B. et al. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of Neospora-associated fetal loss in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.20, p.99–105, 2013.

WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W. et al. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v.121, p.347–58, 2000.

WOUDA, W.; MOEN, A.R.; SCHUKKEN, Y.H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v.49, p.1311–1316, 1998.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A.M.H. et al. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal Parasitology**, v.29, p.1677–1682, 1999.

4 PROFILAXIA DA TRANSMISSÃO DO NEOSPORA CANINUM PELO SÊMEN DE TOUROS

(*Prophylaxis of bull's semen Neospora caninum transmission*)

RESUMO

O conhecimento das vias de transmissão e do ciclo de vida do *Neospora caninum* é importante para a implementação de medidas de controle da doença. Como o DNA de *N. caninum* foi detectado no sêmen fresco e congelado de touros, estudos avaliaram a transmissão venérea do *N. caninum* em bovinos, classificando-a como via de transmissão horizontal. Por esse motivo, são necessárias medidas de precaução para o uso do sêmen de touros infectados com *N. caninum*. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um diluente, para criopreservação de sêmen de touro, eficiente na profilaxia da transmissão venérea do *N. caninum*. O teste dos antimicrobianos (experimento 1) - trimetoprim isolado (TRI) e associado com sulfadiazina (SDT) e sulfametoxazol (SMT), claritromicina (CLA), eritromicina (ERI), azitromicina (AZI) e clindamicina (CLI) – foi realizado utilizando cultivo celular inoculado com 10^4 taquizoítas de *N. caninum* sendo avaliado quanto à presença de taquizoítas livres e ao efeito citopático na monocamada por meio de microscópio invertido. Com os resultados obtidos a partir do teste dos princípios ativos e associações em cultivo celular, os antimicrobianos que se mostraram eficientes no controle dos taquizoítas *in vitro* foram utilizados no preparo do diluente para o sêmen. Cada meio diluidor foi avaliado quanto à toxicidade em relação às células espermáticas (experimento 2). O ejaculado bovino coletado foi dividido em 8 grupos, sendo que 7 grupos receberam um antibiótico no meio diluidor para criopreservação e 1 não recebeu (grupo controle). Foram realizadas análises de cinética espermática em sistema automatizado (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA), e reação acrossomal e potencial mitocondrial das amostras criopreservadas por citometria de fluxo. Os grupos não diferiram em relação ao grupo controle quanto aos parâmetros Amplitude de Deslocamento Lateral de Cauda (ALH), Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN). Os grupos SDT, SMT e AZI apresentaram menores valores ($P<0,05$) de Velocidade de Trajeto (VAP) em relação ao grupo controle. A Velocidade Progressiva (VSL) foi inferior nos grupos SMT e AZI ($P<0,05$) e a Frequência de Batimentos de Cauda (BCF) também foi inferior nos grupos CLI e AZI ($P<0,05$). Os valores de Velocidade Curvilinear (VCL) dos grupos SDT, SMT e CLA apresentaram-se menores que o grupo controle ($P<0,05$). Em relação à Motilidade Total (MT) e Motilidade Progressiva (MP), os grupos SMT, ERI e AZI apresentaram menores valores ($P<0,05$) quando comparados com o grupo controle. Da mesma forma, os grupos SMT e AZI apresentaram mais defeitos morfológicos. Quanto à citometria de fluxo, os grupos SDT, SMT e AZI apresentaram porcentagens significativamente maiores ($P<0,05$) de espermatozoides com reação acrossomal em relação ao grupo controle. E os grupos SDT, SMT e CLA apresentaram valores significativamente menores ($P<0,05$) de Alto Potencial Mitocondrial (HPM) quando comparados ao controle. No entanto, os grupos CLI e CLA apresentaram valores superiores de HPM. Os antibióticos efetivos contra o *N. caninum* e que não foram deletérios aos espermatozoides, e por isso podem ser adicionados aos meios diluidores para criopreservação de sêmen de touros, foram a clindamicina, a claritromicina e o trimetoprim isolado.

Palavras-chave: neosporose, bovinos, sêmen, antibiótico, diluente

ABSTRACT

The knowledge of the transmission pathways and life cycle of *Neospora caninum* is important for an implementation of disease control measures. As *N. caninum* DNA was detected in the fresh and frozen semen of bulls, previous studies evaluated the venereal transmission of *N. caninum* in cattle, classifying it as a horizontal transmission route. For this reason, preventive measures are required for the use of *N. caninum* infected bulls semen from artificial insemination centers. The objective of this present study was developing a diluent for cryopreservation of bull semen that is efficient in the prophylaxis of venereal transmission of *N. caninum*. The antimicrobial test (experiment 1) - trimethoprim isolated (TRI) and associated with sulfadiazine (SDT) and sulfamethoxazole (SMT), clarithromycin (CLA), erythromycin (ERI), azithromycin (AZI) and clindamycin (CLI) - was carried out with cell culture inoculated with 10^4 tachyzoites of *N. caninum* which was evaluated for the presence of tachyzoites and the cytopathic effect in the monolayer using inverted microscope. With the results obtained from the test of the active principles and associations in cell culture, the antimicrobials that demonstrate effective in controlling the tachyzoites *in vitro*, were used in the preparation of the diluent for semen. Each diluent medium was evaluated for sperm cell toxicity (experiment 2). The collected bovine ejaculate was divided into 8 groups, with 7 groups receiving an antibiotic in the diluent medium for cryopreservation and one not receiving (control group). Sperm kinetics in automated system (*Computer Assisted Sperm Analysis* - CASA), and acrosomal reaction and mitochondrial potential performed in flow cytometry in cryopreserved samples. The groups did not differ in relation to the control group regarding the amplitude of lateral head displacement (ALH), straightness (STR) and linearity (LIN) parameters. The SDT, SMT and AZI groups presented lower values ($P < 0.05$) of average path velocity (VAP) in relation to the control group. The straight-line velocity (VSL) was lower in the SMT and AZI groups ($P < 0.05$) and the beat/cross frequency (BCF) was also lower in the CLI and AZI groups ($P < 0.05$). The curvilinear velocity (LCV) values of the SDT, SMT and CLA groups were lower than the control group ($P < 0.05$). In relation to total motility (TM) and progressive motility (PM), the SMT, ERI and AZI groups had lower values ($P < 0.05$) when compared to the control group. Similarly, the SMT and AZI groups showed more morphological defects. As for flow cytometry, the SDT, SMT and AZI groups presented significantly higher ($P < 0.05$) percentages of spermatozoa with reacted acrosome than the control group. And the SDT, SMT and CLA groups presented significantly lower values ($P < 0.05$) of high potential mitochondrial (HPM) when compared to the control group. However, the CLI and CLA groups presented higher values of HPM. The antibiotics effective against *N. caninum* and that were not deleterious to spermatozoa and therefore can be added to the diluent media for cryopreservation of bull semen were clindamycin, clarithromycin and trimethoprim.

Key words: neosporosis, bovine, semen, antibiotic, diluents

4.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento das vias de transmissão e do ciclo de vida do *Neospora caninum* é importante para a implementação de medidas de controle da doença que incluem abate e substituição de animais soropositivos, técnicas de manejo, dentre outras (REICHEL; ELLIS, 2006; DUBEY et al., 2007). Em rebanhos bovinos infectados por *N. caninum*, os programas de controle são baseados na prevenção da transmissão vertical, pela eliminação de animais soropositivos, e diminuição da transmissão horizontal, principalmente, pelo controle do acesso da população dos hospedeiros definitivos considerados fontes de contaminação pois eliminam oocistos nas fezes (DUBEY et al., 2007) às áreas de pastagens dos bovinos. As medidas de manejo como remoção de tecidos potencialmente infectados do ambiente, tais como fetos abortados e placenta, que podem servir como fonte de infecção para os hospedeiros susceptíveis, são recomendadas (ANDERSON et al., 2000).

A saúde reprodutiva dos machos constitui fator decisivo para programas de inseminação artificial. Como o DNA de *N. caninum* foi detectado no sêmen fresco e congelado de touros (ORTEGA-MORA et al., 2003; CAETANO-DA-SILVA et al., 2004; FERRE et al., 2005; SHARIFZADEH et al., 2012), estudos avaliaram a transmissão venérea do *N. caninum* em bovinos, classificando-a como via de transmissão horizontal (SERRANO et al., 2006; SERRANO-MARTINEZ et al., 2007). Sabendo que a neosporose é uma importante causa de problemas reprodutivos, acarretando perdas econômicas significativas no setor agropecuário, são necessárias medidas de precaução para o uso do sêmen de touros infectados com *N. caninum*. E devido a inexistência de trabalhos envolvendo a profilaxia da transmissão venérea do *N. caninum*, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um diluente de sêmen de touro eficiente para o controle da transmissão do *N. caninum*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Experimento 1: Teste *in vitro* dos princípios ativos e associações eficazes contra *Neospora caninum*

4.2.1.1 Manutenção do cultivo celular e dos taquizoítas de *Neospora caninum*

Taquizoítas da cepa NC-1 de *Nespora caninum*, mantidos no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR, foram inoculados em cultivo de células VERO (African Green Monkey kidney cells) em frascos Roux de 25 cm² e mantidos em estufa a 37°C com 5% CO₂. De duas a três vezes na semana, a monocamada do cultivo celular foi avaliada em microscópio invertido (Olympus – CK2) para verificação do efeito citopático, causado pela multiplicação dos taquizoítas, em aumento de 200x. Para a troca de meio do cultivo celular, utilizou-se meio de crescimento F-10 HAM (Sigma, Aldrich) com pH ajustado para 7,4 e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina G potássica, 50 µg/mL de sulfato de estreptomicina, e 1,25 µg/mL de anfotericina B. Quando o tapete celular apresentava-se 50 a 80% destruído, os taquizoítas eram transferidos para um novo frasco de cultivo.

4.2.1.2 Recuperação dos taquizoítas, preparo dos antimicrobianos e teste em cultivo celular

Para a recuperação dos taquizoítas, o tapete celular dos frascos de cultivo celular foi raspado e o conteúdo transferido para tubos Falcon estéreis. E para a liberação dos taquizoítas intracelulares, foi feita passagem do conteúdo por uma agulha 21G, com o intuito de induzir a ruptura das células. A suspensão contendo taquizoítas, células e meio foi centrifugada a 3000 RPM por 5 minutos, e o sobrenadante removido. Os taquizoítas foram lavados duas vezes com solução fisiológica 0,9% estéril e novamente centrifugados.

O número de taquizoítas recuperados foi determinado por contagem em câmara de Neubauer® (Figura 2). O volume final da suspensão foi ajustado para 10^4 taquizoítas em 100µl de solução fisiológica 0,9%. Após a contagem, cada frasco de cultivo, com a monocamada de células VERO estabelecida, foi inoculado com 10^4 taquizoítas totalizando 8 frascos de cultivo celular. Desses, em 7 frascos foi adicionado seu respectivo antimicrobiano ao meio de manutenção F-10 HAM (Sigma, Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino, nos dias de troca.

Figura 2 - Taquizoítas de *Neospora caninum* (setas) na câmara de Neubauer® (400x).



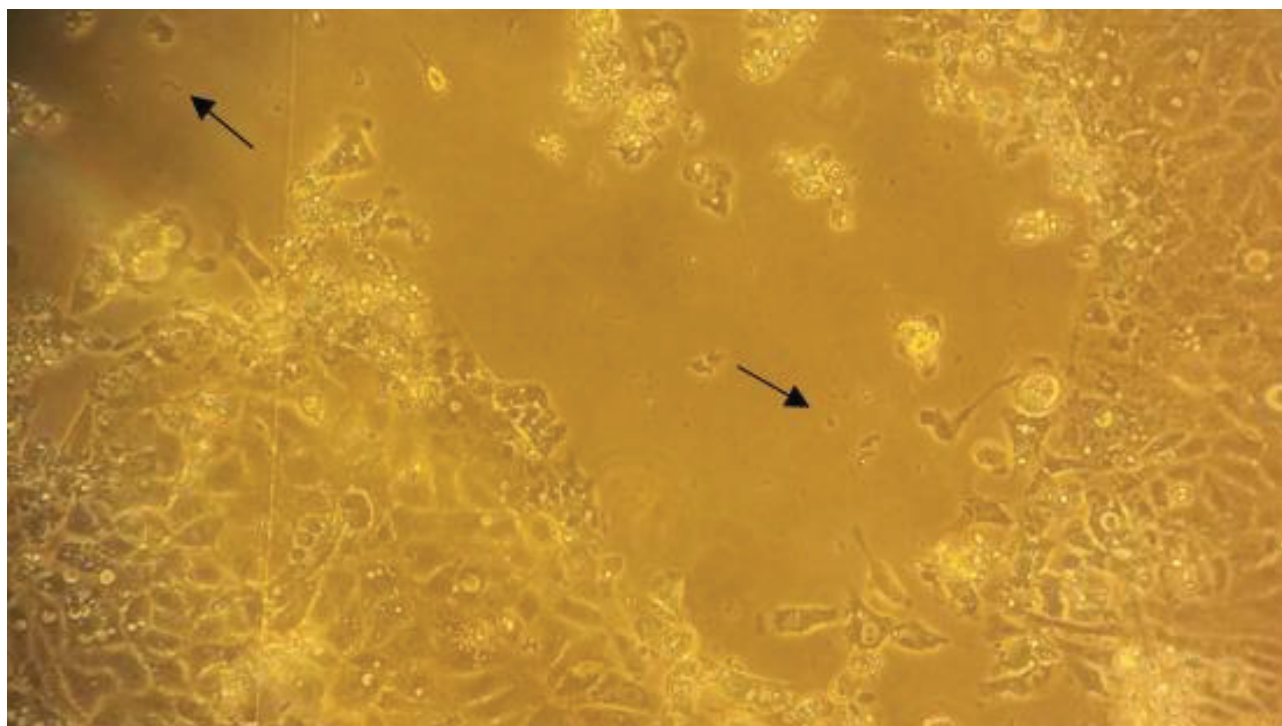
FONTE: arquivo pessoal.

Os antimicrobianos foram pesados em balança analítica (RADWAG – AS 220/C/2) e devido à baixa solubilidade em água, foram dissolvidos em 300µl de Dimetil Sulfoxido (Dimesol®) para então serem diluídos em água destilada. Como o mínimo de pesagem da balança é 10mg, foi necessária a realização de diluição seriada para obter a concentração final desejada do antimicrobiano na solução. Previamente à adição ao meio, o antimicrobiano diluído foi filtrado em filtro de 0,22µm. Um frasco não recebeu antimicrobiano atuando como controle. Após a

inoculação dos taquizoítas de *N. caninum*, os frascos foram avaliados diariamente por 7 dias em Microscópio invertido (Olympus – CK2) para verificação da presença de taquizoítas e do efeito citopático na monocamada de células

Vero em aumento de 200x (Figura 3).

Figura 3 - Efeito citopático na monocamada de células Vero e taquizoítas livres de *Neospora caninum* (setas) no grupo controle (200x).



FONTE: arquivo pessoal.

Os agentes antimicrobiano testados foram duas sulfonamidas (Sulfadiazina – Sigma, Audrich, e Sulfametoxazol – Sigma, Audrich); um inibidor da diidrofolato redutase/ timidilato sintetase (Trimetoprim - Trimethoprim®); três macrolídeos (Claritromicina – Sigma, Audrich, Eritromicina – Eritromicina Inpharma®, Azitromicina – Sigma, Audrich); uma lincosamida (Clindamicina – Sigma, Audrich). O Trimetoprim foi testado isoladamente e em associação com as Sulfonamidas totalizando 7 grupos com antimicrobianos. As concentrações utilizadas dos referidos princípios ativos foram estabelecidas por Lindsay et al. (1994) e Lindsay et al. (1996) em cultivo celular, conforme a tabela 1.

Tabela 1 - Grupos experimentais de antimicrobianos testados em cultivo celular de *Neospora caninum* e seus respectivos princípios ativos e concentrações finais.

Grupos de antimicrobianos	Princípios ativos	Concentração final
Controle	-	-
SDT	Sulfadiazina e Trimetoprim	10,0µg/mL + 1,0µg/mL
SMT	Sulfametoxazol e Trimetoprim	10,0µg/mL + 1,0µg/mL
CLI	Clindamicina	0,01µg/mL
ERI	Eritromicina	0,10µg/mL
CLA	Claritromicina	0,10µg/mL
TRI	Trimetoprim	10,0µg/mL
AZI	Azitromicina	1,0µg/mL

SDT: Sulfadiazina com trimetoprim; SMT: Sulfametoxazol com trimetoprim; CLI: Clindamicina; ERI: Eritromicina; CLA: Claritromicina; TRI: Trimetoprim e AZI: Azitromicina.

4.2.1 Experimento 2: Avaliação da viabilidade espermática após diluição em diluente contendo os antimicrobianos eficientes contra *Neospora caninum*

4.2.1.1 Coleta do sêmen, descrição da técnica e avaliação espermática

Foi utilizado um touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) de 96 meses de idade pesando 900Kg, alojado em baia individual no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, localizado em Curitiba, PR, Brasil. O touro foi mantido com dieta a base de silagem de milho e feno de azevém, com disponibilidade de água e sal mineral *ad libitum*. O animal foi previamente avaliado quanto à normalidade dos parâmetros andrológicos (CBRA, 1998).

O ejaculado foi coletado pelo método de estimulação manual do pênis. Para a realização desta técnica, o reprodutor foi submetido ao processo de condicionamento, que consistiu na realização de massagem perineal e estimulação manual do pênis duas vezes por semana com intervalos regulares, durante três meses consecutivos. Esses procedimentos ocorriam sempre no mesmo horário, mesmo ambiente e foram realizados pela mesma pessoa. Ao término de cada sessão o touro recebeu uma recompensa (alimento) e foi solto em piquete.

Previamente às coletas, o prepúcio foi higienizado com ducha de água morna (36°C) mediante introdução de um tubo flexível no óstio prepucial e então, seco com papel toalha. A coleta pelo método de estimulação manual não foi feita na presença de vaca em estro e não necessitou de contenção do animal. A técnica consistiu em massagem da região perineal, com movimentos de cima para baixo, até que o animal apresentou ereção com exposição da extremidade livre do pênis no óstio prepucial. Após a ereção, foi exercida pressão com os dedos na glândula até que o animal respondeu com movimentos de fricção. No momento da propulsão, o corpo do pênis foi segurado e pressionado com a mão enluvada, para mimetizar a vagina da vaca, e o copo coletor foi posicionado na extremidade livre do pênis para coleta do ejaculado (Figura 4). Após a coleta, a amostra foi acondicionada em banho maria a 36°C e avaliada quanto às características macroscópicas e microscópicas do sêmen, de acordo com CBRA (1998).

Figura 4 - Técnica de coleta de sêmen por estimulação manual do pênis no touro (A: massagem na região perineal; B: pressão digital da glândula; C: coleta do ejaculado no momento da propulsão).



FONTE: Arquivo pessoal.

4.2.1.2 Preparo do diluente de sêmen com os princípios ativos selecionados a partir do teste em cultivo celular

Com os resultados obtidos a partir do teste dos princípios ativos e associações em cultivo celular realizado em triplicata (experimento 1), os antimicrobianos que se mostraram eficientes no controle dos taquizoítas *in vitro* foram utilizados no preparo do diluente para o sêmen. Foi utilizado meio diluidor Tris-gema composto pelas frações A e B. Para cada 100mL de diluente preparou-se

1,75g de ácido cítrico; 3,028g de Tris-Hidroximetilaminometano; 1,25g de frutose; 2% de gema de ovo e q.s.p de água destilada contendo os antimicrobianos testados para atingir o volume final. À fração B também foi adicionado 7% de glicerol como crioprotetor (Paufler e Mitautoren, 1974).

Cada grupo recebeu um antimicrobiano que foi pesado em balança analítica (RADWAG – AS 220/C/2) e devido à baixa solubilidade em água, foi dissolvido em 300µl de Dimetil Sulfóxido (Dimesol®) para então ser diluído em água destilada. Como o mínimo de pesagem da balança era 10mg, foi necessária a realização de diluição seriada para obter a concentração final testada do antimicrobiano no experimento anterior para o preparo do diluente. Os grupos foram dispostos de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 - Grupos experimentais de antimicrobianos com seus respectivos princípios ativos utilizados no preparo do diluente para criopreservação de sêmen de touro.

Grupos de antimicrobianos	Princípios ativos	Concentração final
Controle	-	-
SDT	Sulfadiazina e Trimetoprim	10,0µg/mL + 1,0µg/mL
SMT	Sulfametoxazol e Trimetoprim	10,0µg/mL + 1,0µg/mL
CLI	Clindamicina	0,01µg/mL
ERI	Eritromicina	0,10µg/mL
CLA	Claritromicina	0,10µg/mL
TRI	Trimetoprim	10,0µg/mL
AZI	Azitromicina	1,0µg/mL

SDT: Sulfadiazina com trimetoprim; SMT: Sulfametoxazol com trimetoprim; CLI: Clindamicina; ERI: Eritromicina; CLA: Claritromicina; TRI: Trimetoprim e AZI: Azitromicina.

4.2.1.3 Processamento e congelamento do sêmen

Após a coleta e avaliação do sêmen, a amostra foi fracionada em oito grupos experimentais (mesma partida), sendo que à cada grupo foi adicionado o diluente Tris-gema-glicerol (fração A e fração B) contendo o antimicrobiano referente ao grupo. Ao grupo controle não foi adicionado antimicrobiano. Após a diluição do sêmen, os grupos foram novamente avaliados e então envasados em palhetas de

0,25mL com concentração de 30×10^6 espermatozoides viáveis cada, devidamente identificadas e lacradas com álcool polivinílico.

Após o envase e fechamento, as palhetas foram submetidas ao período de estabilização em container de transporte (Botutainer®) a 5°C por quatro horas. Após esse período, as palhetas foram dispostas horizontalmente sobre um suporte de alumínio a uma distância de 5 cm do vapor de nitrogênio líquido em uma caixa de isopor (51 x 45 x 45 cm) por 15 minutos. Em seguida, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e após o término do processo de congelação foram acondicionadas em raques e colocadas em canisteres no botijão criogênico, para posterior avaliação espermática.

4.2.1.4 Avaliação espermática após descongelação

Cada grupo experimental foi avaliado em triplicata, sendo que as palhetas foram submetidas a análise após descongelação em banho maria a 37°C por 30 segundos (CBRA, 1998). As avaliações pós-descongelação foram: morfologia espermática em formol salina, cinética espermática pela análise computadorizada e ocorrência de reação acrossomal e função mitocondrial das células espermáticas pela citometria de fluxo.

4.2.1.5 Morfologia espermática em formol salina

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozoides uma alíquota de 20µL de sêmen foi diluída em 2mL de solução tamponada de formol salina, e então foi estocada à temperatura de 4 a 5°C para posterior leitura. A morfologia espermática foi avaliada em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x sob imersão através de preparações úmidas, classificando 200 células por preparação (BLOM, 1973). Os defeitos foram agrupados e classificados como de acrossoma e de cauda.

4.2.1.5.1 Análise computadorizada da cinética espermática

Para a análise computadorizada da cinética espermática utilizou-se o CASA (“Computer Assisted Sperm Analysis”, “Hamilton Thorne Motility Analyser” - HTMA – IVOS 12). Após a descongelação de cada palheta, uma gota de 20µL de sêmen de cada um dos grupos experimentais foi colocada na câmara de Makler aquecida a 38°C para as análises das variáveis espermáticas. As análises foram realizadas em *setup*, ajustado para as características seminais de bovinos e foram avaliados aleatoriamente três campos de cada amostra. As variáveis espermáticas avaliadas foram: motilidade espermática total (MT, %), motilidade espermática progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm), frequência de batimento da cauda (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

4.2.1.5.2 Citometria de fluxo

A avaliação espermática por citometria de fluxo foi realizada em equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) equipado com lasers de excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm e 695/40nm; vermelho 640-nm, 40 mW com filtro 660/20nm; e o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro 450/50nm. Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial das células espermáticas pela citometria de fluxo, utilizou-se a associação das seguintes sondas: Hoechst 33342 (H342, Sigma – Aldrich); Iodeto de Propídio (IP, Sigma – Aldrich); Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao Isotiocionato de Fluoresceína (FITC-PSA, Sigma – Aldrich) e MitoStatus Red (BD Pharmigen) (FREITAS-DELL’AQUA et al., 2012; CAMARGO et al., 2016).

Para cada 200µL de sêmen de cada grupo foram adicionados 1,5µM de IP; 7,0µM de H342; 1,0ng de FITC-PSA e 20nM de Mitostatus Red. Essas amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos em banho maria a 37°C e então submetidas a citometria de fluxo para leitura. No mínimo 10.000 células

espermáticas foram analisadas em cada grupo e os dados foram avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1.

Após a leitura, os espermatozoides foram avaliados e classificados conforme a integridade das membranas plasmática e acrossomal em: membranas plasmática e acrossomal íntegras (MPAI); membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada (MPIAL); membrana plasmática lesada e membrana acrossomal íntegra (MPLAI) e; membranas plasmática e acrossomal lesadas (MPAL). Para a avaliação da porcentagem de espermatozoides com reação acrossomal foram somados os MPIAL e MPAL e para a avaliação da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada foram somados MPLAI e MPAL de acordo com Celeghini et al. (2008). Para análise do potencial mitocondrial (HPM) foram utilizados os valores de mediana de intensidade de fluorescência dentro do grupo MPAI, segundo Camargo et al., (2016).

4.2.2 Análise estatística

Os dados obtidos no experimento foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. As variáveis apresentaram distribuição anormal sendo então utilizado o teste de variância RM ANOVA on Rankes, seguido pelo método Dunnett's para comparação dos grupos experimentais com o grupo controle. O programa estatístico utilizado foi o Sigma Plot™ 12.0 (software Systat, San Jose, CA), com nível de significância de 5%.

4.2.3 Comitê de ética de uso animal

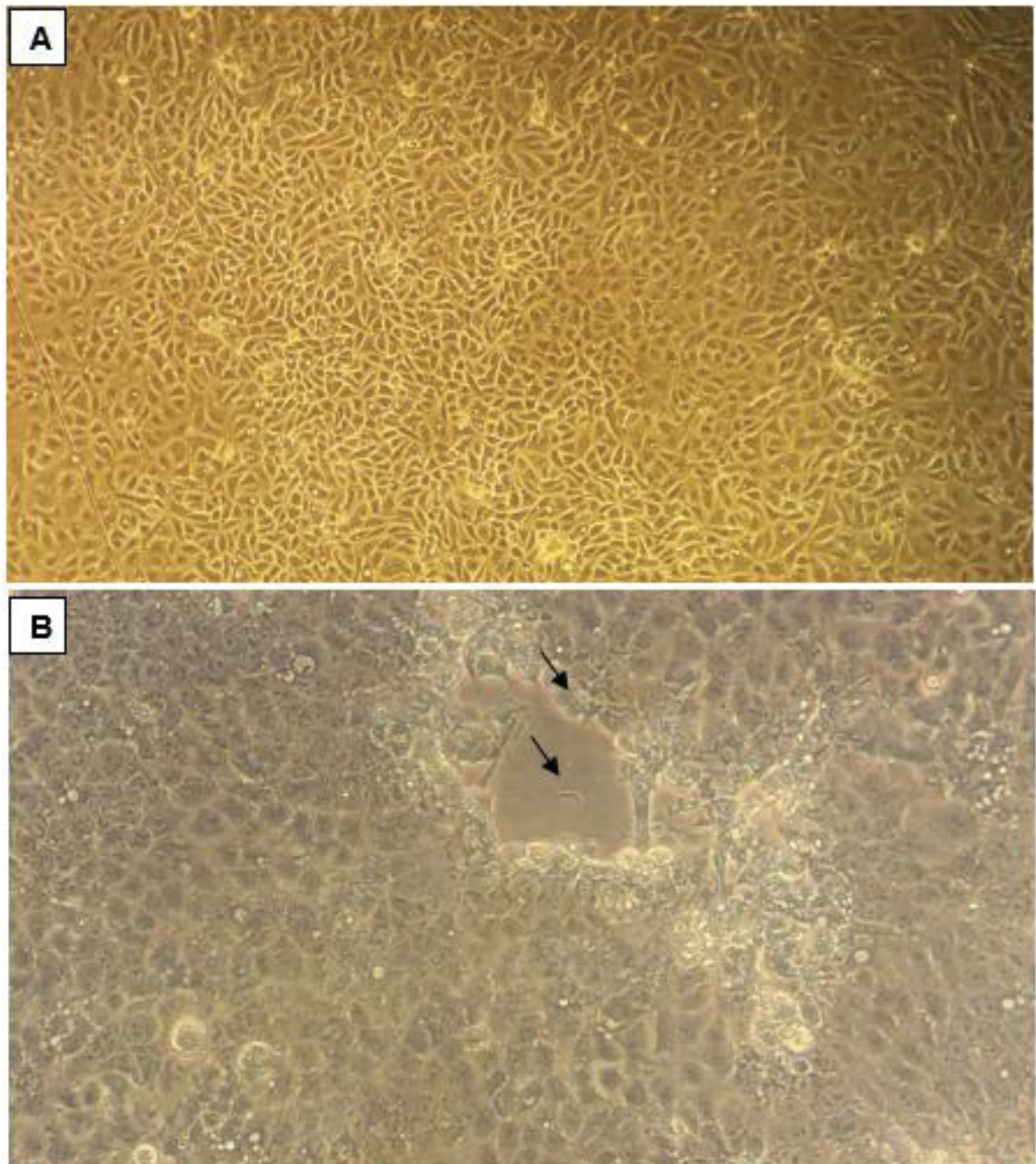
Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba-PR, em 03 de novembro de 2016, sob protocolo nº 113/2016.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Experimento 1: Teste *in vitro* dos princípios ativos e associações eficazes contra *Neospora caninum*

Todos os antimicrobianos testados (claritromicina, eritromicina, azitromicina, clindamicina e o trimetoprim isolado e em associação com a sulfadiazina e o sulfametoxazol) apresentaram eficácia em relação ao controle dos taquizoítas inoculados nos frascos de cultivo celular. Grupos de taquizoítas intracelulares, ruptura do tapete celular e taquizoítas livres foram observados somente no grupo controle no decorrer de uma semana da inoculação, enquanto nos frascos contendo o meio de manutenção com os diferentes antimicrobianos testados (CLA, ERI, AZI, CLI, TRI, SDT, SMT), essas alterações não ocorreram (Figura 5).

Figura 5 - A: Tapete celular íntegro e ausência de taquizoítas livres de *Neospora caninum* no grupo experimental AZI. B: Efeito citopático, presença de taquizoítas livres e taquizoítas intracelulares no grupo controle com 5 dias de cultivo celular (200x).



FONTE: Arquivo pessoal.

4.3.2 Experimento 2: Avaliação da viabilidade espermática após diluição em diluente contendo os antimicrobianos

A média \pm desvio padrão da motilidade total, motilidade progressiva, defeitos de acrossoma e de cauda, reação acrossomal, HPM e MP lesada dos espermatozoides estão descritas na tabela 3. Em relação a MT e MP, os grupos SMT, ERI e AZI apresentaram menores valores ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo controle. Da mesma forma, os grupos SMT e AZI apresentaram mais defeitos de acrossoma e de cauda. Em relação a citometria de fluxo, os grupos SDT, SMT e AZI apresentaram porcentagens significativamente maiores ($p < 0,05$) de espermatozoides com reação acrossomal e com membrana plasmática lesada em relação ao grupo controle. E os grupos SDT, SMT e CLA apresentaram valores significativamente menores ($p < 0,05$) de HPM quando comparados ao controle.

Tabela 3 - Média \pm desvio padrão da MT (motilidade total) (%), MP (motilidade progressiva) (%), Defeitos de acrossoma (%), Defeitos de cauda (%), Espermatozoides com reação acrossomal (%), Espermatozoides com MP lesada (%) e HPM (alto potencial mitocondrial) (%) das amostras descongeladas de sêmen dos grupos experimentais.

Grupos (n=3)	MT (%)	MP (%)	Defeitos de acrossoma (%)	Defeitos de cauda (%)	Reação acrossomal (%)	MP lesada (%)	HPM (%)
Controle	65,7 \pm 2,08	46,7 \pm 1,53	3,33 \pm 0,58	6 \pm 1	29,8 \pm 0,1	53,2 \pm 0,75	32,7 \pm 0,58
SDT	63 \pm 1	39,3 \pm 0,58	2,67 \pm 0,57	8 \pm 2	39,4 \pm 0,55*	68,4 \pm 2,05*	23,6 \pm 0,58*
SMT	28,3 \pm 1,53*	17,6 \pm 2,08*	11,7 \pm 3,51*	19 \pm 1*	66,1 \pm 1,15*	93,4 \pm 0,93*	3,2 \pm 0,3*
CLI	61,7 \pm 1,53	39,7 \pm 1,15	6,3 \pm 0,58	4 \pm 2	33,2 \pm 0,05	58,8 \pm 0,21	33,9 \pm 0,4
ERI	51 \pm 1*	31,3 \pm 1,53*	4 \pm 0	5,3 \pm 1,53	36,3 \pm 0,15	60,2 \pm 0,55	32,8 \pm 1,15
CLA	61 \pm 2	37 \pm 1	1,3 \pm 1,15	4,3 \pm 0,58	37,5 \pm 0,55	64,8 \pm 0,15	24,7 \pm 0,8*
TRI	62,3 \pm 2,08	39 \pm 0	3,7 \pm 1,15	7 \pm 1,73	36,8 \pm -0,7	67,8 \pm 1,8	37,1 \pm 0,26
AZI	29,7 \pm 0,58*	16,3 \pm 1,15*	8,3 \pm 1,15*	22,3 \pm 7,01*	47,6 \pm 1,45*	77,7 \pm 1,4*	30,6 \pm 11,52

SDT: Sulfadiazina com trimetoprim; SMT: Sulfametoxazol com trimetoprim; CLI: Clindamicina; ERI: Eritromicina; CLA: Claritromicina; TRI: Trimetoprim e AZI: Azitromicina; MP: Membrana plasmática.

*Valores apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Os grupos com adição de antimicrobianos não diferiram em relação ao grupo controle quanto aos parâmetros ALH, STR e LIN. Os grupos SDT, SMT e AZI apresentaram menores valores ($p < 0,05$) de VAP em relação ao grupo controle. VSL foi inferior nos grupos SMT e AZI ($p < 0,05$) e BCF também foi inferior nos grupos CLI

e AZI ($p < 0,05$). Os valores de VCL dos grupos SDT, SMT e CLA apresentaram-se menores que o grupo controle ($p < 0,05$) (tabela 4).

Tabela 4 - Média \pm desvio padrão da VAP (velocidade de trajeto) ($\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade progressiva) (m/s), VCL (velocidade curvilínea) ($\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude de deslocamento lateral de cauda) (μm), BCF (frequência de batimento de cauda) (hz), STR (retinearidade) (%) e LIN (linearidade) (%) das amostras descongeladas de sêmen dos grupos experimentais.

Grupos (n=3)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL (m/s)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
Controle	49,4 \pm 0,95	44,6 \pm 0,42	67,6 \pm 0,35	3,4 \pm 0,31	16,8 \pm 0,23	19 \pm 1	19 \pm 2
SDT	36,7 \pm 0,9*	35,3 \pm 1,05	52,7 \pm 1,05*	3,0 \pm 0,95	16,4 \pm 0,1	17 \pm 0,58	18 \pm 0,58
SMT	35,4 \pm 1,75*	30,6 \pm 0,55*	52,4 \pm 0,45*	3,0 \pm 0,45	16,4 \pm 0,25	17 \pm 0,58	18 \pm 2
CLI	41,3 \pm 0,3	33,6 \pm 1,4	62,2 \pm 0,32	2,9 \pm 0,06	15,3 \pm 0,06*	17 \pm 0,58	17 \pm 0
ERI	47,5 \pm 0,5	42,6 \pm 0,4	64,6 \pm 0,85	3,4 \pm 0,45	16,3 \pm 0,3	17 \pm 0,58	18 \pm 0,58
CLA	39,4 \pm 0,56	36,2 \pm 0,6	55,3 \pm 0,3*	3,2 \pm 0,2	15,6 \pm 0,21	18 \pm 0	18 \pm 1,53
TRI	47,1 \pm 0,8	44,6 \pm 0,26	61,3 \pm 0,6	3,4 \pm 0,06	16,8 \pm 0,1	18 \pm 0,58	19 \pm 1
AZI	37,9 \pm 0,85*	32,6 \pm 0,5*	57,7 \pm 1	3,2 \pm 0,12	14,5 \pm 0,5*	17 \pm 0	19 \pm 1

SDT: Sulfadiazina com trimetoprim; SMT: Sulfametoxazol com trimetoprim; CLI: Clindamicina; ERI: Eritromicina; CLA: Claritromicina; TRI: Trimetoprim e AZI: Azitromicina.

*Valores apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

4.4 DISCUSSÃO

No teste *in vitro*, os antimicrobianos claritromicina, clindamicina, azitromicina e eritromicina mostraram-se eficientes no controle da multiplicação dos taquizoítas de *N. caninum*. Esses princípios ativos foram testados por Lindsay et al. (1994) que da mesma forma observaram eficácia contra *N. caninum*. Posteriormente, Lindsay et al. (1996) testaram o sinergismo entre sulfonamidas e DHFR/TS (inibidor da diidrofolato redutase/ timidilato sintetase). No presente trabalho, foram avaliadas as associações entre duas sulfonamidas (sulfadiazina e sulfametoxazole) e o trimetoprim, e os resultados obtidos corroboram a eficiência das concentrações testadas anteriormente.

Um ponto imprescindível é que os princípios ativos utilizados nos diluidores de sêmen não devem apresentar toxicidade para as células espermáticas. O efeito adverso tem sido associado a alguns antibióticos (Back et al., 1975), pois estes podem afetar a funcionalidade e a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. Até o presente momento não existem trabalhos testando a interação de clindamicina, claritromicina, azitromicina, trimetoprim isolado e em associação às sulfas com as células espermáticas.

No presente estudo, o grupo ERI apresentou valores de MT e MP inferiores ao grupo controle, porém os espermatozoides não apresentaram mais defeitos de acrossoma e de cauda. De acordo com Stallcup e McCartney (1953) e Back et al. (1975), a eritromicina se mostrou deletéria para os espermatozoides de mamíferos quando adicionada aos diluentes de sêmen. Os grupos SMT e AZI apresentaram menores valores de motilidade e maior porcentagem de defeitos de acrossoma e de cauda. A correlação negativa existente entre motilidade e defeitos espermáticos descrita por Saacke et al., 2000, justifica esses resultados. Desta forma, esses antibióticos não são recomendados para uso nos diluidores de sêmen pois segundo Maia et al., (2009), a MT e MP têm correlação positiva com a viabilidade espermática e valores inferiores podem prejudicar a fertilidade do sêmen. Esses parâmetros estão intimamente relacionados à capacidade de a célula espermática atingir o sítio de fecundação (DORADO et al., 2011), assim, baixos valores de motilidade resultam em baixas taxas de prenhez. Muitos antibióticos adicionados aos extensores seminais não afetam a motilidade espermática (Varner, 1991), fato observado com os demais princípios ativos testados. Com base nos achados deste estudo, os antimicrobianos SMT, ERI e AZI devem ser evitados na formulação do meio diluidor de sêmen por afetarem negativamente a motilidade espermática.

A avaliação da ocorrência de reação acrossomal e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides é feita pela associação de sondas fluorescentes (JOHANNISSON et al., 2009; DORADO et al., 2013; DEL OLMO et al., 2013). A reação acrossomal, caracterizada pela liberação das enzimas presentes no acrossoma, é um evento importante que permite a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito no momento da fertilização (VERSTEGEN et al., 2002). E a membrana plasmática exerce papel fundamental para a sobrevivência do espermatozoide (PARKS; GRAHAM, 1992), pois é responsável pela manutenção da osmolaridade da célula espermática. Desta forma, é ideal que a membrana plasmática esteja íntegra e o acrossoma, preservado, bem como suas enzimas (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001; KASTELIC; THUNDATHIL, 2008). Os grupos SDT, SMT e AZI apresentaram maiores porcentagens de espermatozoides com reação acrossomal e com membrana plasmática lesada, provavelmente, como consequência da alteração da osmolaridade e do pH, e da presença de espécies reativas ao oxigênio (ROS) no

meio diluidor. Nesse caso, possivelmente ocorreria falha na fertilização caso se utilizasse sêmen em meio diluidor contendo esses antimicrobianos.

No presente estudo, observou-se que os grupos SMT e AZI apresentaram redução na motilidade espermática acompanhada de maiores porcentagens de espermatozoides com reação acrossomal, corroborando os resultados obtidos por Silva et al. (2006), os quais observaram uma correlação negativa entre reação acrossomal e motilidade espermática progressiva pós-descongelamento de sêmen caprino.

Em relação à função mitocondrial das células espermáticas, os grupos experimentais SDT, SMT e CLA apresentaram menores valores de HPM, significando que as mitocôndrias dos espermatozoides desses grupos possuem menor capacidade de produção de ATP destinada à movimentação da cauda. De acordo com Troiano et al. (1998), existe uma correlação significativa entre potencial mitocondrial e motilidade. Embora no presente trabalho não tenha sido realizado comparação entre parâmetros, somente o grupo SMT apresentou menores valores de HPM, MT e MP, simultaneamente.

Os grupos SDT, SMT, AZI e CLA apresentaram redução nas velocidades (VAP, VSL e VCL) quando comparados ao grupo controle. Isso pode decorrer do baixo potencial mitocondrial apresentado pelos mesmos grupos, exceto o grupo AZI. Amirat et al. (2004) e Celeguini et al. (2008), em seus estudos com diferentes meios diluidores para criopreservação de sêmen, observaram diferenças nas velocidades dos espermatozoides possivelmente pelas diferenças na densidade dos diluidores ou pela presença de partículas maiores que influenciam a velocidade dos espermatozoides o que pode justificar os dados encontrados no presente trabalho. Em relação ao parâmetro BCF, os grupos CLI e AZI também apresentaram menores valores enquanto os demais grupos mostraram-se semelhantes ao controle. Segundo Hoflack et al. (2007), valores elevados para BCF e STR resultam em movimentos espermáticos progressivos mais rápidos devido a maior força propulsora. No entanto, somente o grupo AZI apresentou simultaneamente valores menores de BCF e VSL, enquanto o grupo CLI apresentou valor menor de BCF mas com VSL semelhante a do grupo controle. Visto isso, supõem-se que a clindamicina e a azitromicina podem ser compostos que inibem a frequência de batimentos de cauda. O parâmetro ALH está relacionado com a capacidade de o espermatozoide

penetrar na zona pelúcida do oócito (VERSTEGEN et al., 2002). No presente trabalho, todos os grupos mostraram-se semelhantes estatisticamente com o grupo controle, sendo então, não possível julgar os grupos em relação a esse parâmetro espermático que tem efeito sobre a fertilização.

Desta forma nas condições deste estudo, os antibióticos que apresentaram melhores resultados foram a clindamicina e o trimetoprim isolado e, portanto, podem ser adicionados ao meio diluidor de sêmen bovino. Esses princípios ativos não diferiram estatisticamente quando comparados ao grupo controle em relação aos parâmetros de viabilidade espermática. No entanto a claritromicina ainda se mostrou aplicável pois mesmo diminuindo a capacidade das mitocôndrias na produção de ATP, o grupo que recebeu esse antimicrobiano apresentou similaridade em relação à motilidade e aos defeitos de acrossoma com o grupo controle, parâmetros esses importantes na fertilidade do macho.

Em decorrência da preocupação com a resistência antimicrobiana dos microrganismos, recomenda-se que os reprodutores bovinos sejam testados antes de serem utilizados nos programas de inseminação artificial. Desta forma, aqueles princípios ativos testados, que foram eficientes no controle do *N. caninum* nesse experimento, devem ser usados somente nos diluentes de sêmen de reprodutores soropositivos para o protozoário em questão. Enquanto para os demais touros soronegativos para *N. caninum*, pode-se utilizar os antibióticos convencionais.

4.5 CONCLUSÕES

Conclui-se que os antibióticos efetivos contra o *Neospora caninum* e que não foram deletérios aos espermatozoides foram a clindamicina, claritromicina e trimetoprim isolado. Portanto, esses princípios ativos podem ser adicionados aos meios diluidores para criopreservação de sêmen de touros soropositivos. Os demais antimicrobianos testados (trimetoprim associado a sulfadiazina e ao sulfametoxazole, eritromicina e azitromicina) não são recomendados pois afetaram diretamente a viabilidade espermática, nas condições deste experimento.

REFERÊNCIAS

- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNAAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COUNTERS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro ´ fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895–907, 2004.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.417–31, 2000.
- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v.25, p.383391, 1973.
- BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1915-1925, 2001.
- CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.62, p.1329–1336, 2004.
- BACK, D.G.; PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; SEIDEL, G.E. Effect of antimicrobial agentes on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. **Journal Animal Science**, v.41, p.137-143, 1975.
- CAMARGO, L.S.; FREITAS-DELL’AQUA, C.P.; SCHMIT, R.; GUASTI, P.N.; VOLPATO, M.S.A.; SOUZA, F.F. New multicolor protocol to assessment dog spermatozoa by flow cytometer. Poster abstracts. VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction, November 6-9, 2016, Campos do Jordão, SP, Brazil.
- CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O.; ARRUDA, R.P. Use of CMXRos and JC-1 on mitochondrial function evaluation, associated to fluorescent probes to plasmatic and acrosomal membranes evaluation in bovine spermatozoa. **Acta Science Veterinary**, v.33, p.321, 2005.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2–4, p. 119–131, 2008.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.
- DEL OLMO, E., BISBAL, A., MAROTO-MOLARES, A., GARCÍA-ALVAREZ, O., RAMON, M., JIMENEZ-RABADAN, P., MARTÍNEZ-PASTOR, F. SOLER, A.J., GARDE, J.J., FERNANDEZ-SANTOS, M.R. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, v.138, p.102-109, 2013.

DORADO, J.; ALCARÁZ, L.; DUARTE, N.; PORTERO, J. M.; ACHA, D.; HIDALGO, M. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradiente. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.211-218, 2011.

DORADO, J., ALCARAZ, L., GÁLVEZ, M. J., ACHA, D., ORTIZ, I. URBANO, M., HIDALGO, M. Single-layer centrifugation through PureSperm® 80 selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed dog sêmen. **Animal Reproduction Science**, v.140, p.232-240, 2013.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Review**, v.20, p.323–367, 2007.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTEGARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, p.1504-1518, 2005.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D.; DELL'AQUA Jr, J.A.; PAPA, F.O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **Animal Reproduction**, v.9, p.941, 2012.

HOFLACK, G.; OPSOMER, G.; RIJSSELAERE, T. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian bulls. **Reproduction Domestic Animals**, v.42, p.153-161, 2007.

JOHANNISSON, A., MORRELL, J. M., THORÉN, J., JONSSON, M., DALIN, A.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.119-128, 2009.

LINDSAY, D.S.; RIPPEY, N.S.; COLE, R.A.; PARSONS, L.C.; DUBEY, J.P.; TIDWELL, R.R.; BLAGBURN, B.L. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. **American Journal Veterinary Research**, v.55, n.7, p.976-981, 1994.

LINDSAY, D.S.; BUTLER, J.M.; RIPPEY, N.S.; BLAGBURN, B.L. Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolate reductase/thymidylate synthase inhibitors against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine. **American Journal Veterinary Research**, v.57, n.1, p.68-72, 1996.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, v.33, p.183-193, 2009.

ORTEGA-MORA, L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA,

C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.301–308, 2003.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

PAUFLER, S. K.; MITAUTOREN. Kunstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Hannover: 1974.

REICHEL, M. P.; ELLIS J.T. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? **Veterinary Parasitology**. v.142, p.23–34, 2006.

SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.663-677, 2000.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTÍNEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3-4, p. 197-203, 2006.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R. A.; MARTINEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v.67, p.729–737, 2007.
SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P.G. PCR assay for detection of *Neospora caninum* in fresh and frozen semen specimens of Iranian bulls. **World Applied Science Journal**, v.17, n.6, p.742-749, 2012.

SILVA, A.F.; COSTA, E.P.; OLIVEIRA, F.A.; TORRES, C.A.A.; HASS, G.T.S.; NASCIMENTO, V.A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de zootecnia**, v.35, n.2, p.452-456, 2006.

STALLCUP, S.S.; MCCARTNEY, H.K. Toxicity to bull spermatozoa of terramycin hydrochloride and its use as an antibacterial agente in diluentes. **Journal dairy Science**, v.36, p.293, 1953.

TROIANO, L.; GRANATA, A.M.; COSSARIZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in Human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, v.241, p.384-393, 1998.

VARNER, D.D. Composition of seminal extenders and its effect on motility of equine spermatozoa. In: Proceedings of the Annual Meeting Society for Theriogenology, p.146–150, 1991.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

REFERÊNCIAS

- AGUADO-MARTÍNEZ, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; RISCO-CASTILLO, V.; MARUGÁN-HERNÁNDEZ, V.; ORTEGA-MORA, L.M. Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice. **Vaccine**, v.27, p.7331–7338, 2009.
- ALI, H., ALA-UD-DIN, H. A. SAMAD, S. ALI AND M. A. SABRI. Comparative effects of combiotic, ampicillin and gentamycin sulphate on motility percentage liveability and absolute index of liveability in the buffalo bull semen. **Pakistan Veterinary Journal**, v.14, p.223-227, 1994.
- ALMERÍA, S.; LOPEZ-GATIUS, F.; GARCIA-ISPIERTO, I.; NOGAREDA, C.; BECH-SABAT, G.; SERRANO, B.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J.L. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.323–329, 2009.
- ALMERÍA, S.; ARAUJO, R.; TUO, W.; LOPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J.P.; GASBARRE, L.C. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.304–311, 2010.
- AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNAAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COUNTERS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895–907, 2004.
- ANDERSON, M.L.; BLANCHARD, P.C.; BARR, B.C.; DUBEY, J.P.; HOFFMAN, R.L.; CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.198, p.241–244, 1991.
- ANDERSON, M.L.; REYNOLDS, J.P.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; PACKHAM, A.E.; BARR, B.C.; CONRAD, P.A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.210, p.1169–1172, 1997.
- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.417–31, 2000.
- ANDRABI, S. M. H., N. AHMAD, A. ABBAS AND M. ANZAR. Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal bull semen. **Pakistan Veterinary Journal**, v.21, p.166-169, 2001.
- BACK, D.G.; PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; SEIDEL, G.E. Effect of antimicrobial agents on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. **Journal Animal Science**, v.41, p.137-143, 1975.
- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARE, J.; LAMOTHE, P.; SAUVE, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in

cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.218, p.1803–1806, 2001.

BARBER, J. S.; TREES, A. J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Veterinary Record**, v. 139, n. 18, p. 439-443, 1996.

BARR, B.C.; ROWE, J.D.; SVERLOW, K.W.; BONDURANT, R.H.; ARDANS, A.A.; OLIVER, M.N.; CONRAD, P.A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. **Journal Veterinary Diagn. Invest.** v.6, p.207–215, 1994.

BARTELS, C.J.M.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands 1995 to 1997. **Theriogenology**, v.52, p.247–257, 1999.

BARTELS, C.J.; ARNAIZ-SECO, J.I.; RUIZ-SANTA-QUITERA, A.; BJORKMAN, C.; FROSSLING, J.; VON BLUMRODER, D.; CONRATHS, F.J.; SCHARES, G.; VAN MAANEN, C.; WOUDA, W.; ORTEGA-MORA, M. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in germany, The Netherlands, Spain and Sweden. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.17–27, 2006.

BARTLEY, P.M.M.; WRIGHT, S.E.M.; MALEY S.W.D.; MACALDOWIE, C.N.; NATH, M.; HAMILTON, C.M.; KATZER, F.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. **Veterinary Research**, 43: 38, 2012.

BENAVIDES, J.; KATZER, F.; MALEY, S.W.; BARTLEY, P.M.; CANTOM, G.; PALAREA-ALBALADEJO, J.; PURSLOW, C.A.; PANG, J.; ROCCHI, M.S.; CHIANINI, F.; INNES, E.A. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. **Veterinary Research**, 43, 83, 2012.

BENAVIDES, J.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; FERRE, I.; PEREZ, V.; CAMPERO, C.; MOTA, R.; INNES, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Experimental ruminant models for bovine neosporosis: what is know and what is needed. **Parasitology**, v.141, p.1471–1488, 2014.

BJERKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift Fur Parasitenkunde**, v.70, p.271–274, 1984.

BJORKMAN, C.; HOLMDAHL, O.J.; UGGLA, A. An indirect enzyme-linked immunoassay ELISA. For demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.68, p.251–260, 1997.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v.25, p.383391, 1973.

BIELANSKI, A.; ROBINSON, J.; PHIPPS-TODD, B. Effect of *Neospora caninum* on in vitro development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. **Veterinary Record**, v.150, p.316–318, 2002.

CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.62, p.1329–1336, 2004.

CAMARGO, L.S.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; SCHMIT, R.; GUASTI, P.N.; VOLPATO, M.S.A.; SOUZA, F.F. New multicolor protocol to assessment dog spermatozoa by flow cytometer. Poster abstracts. VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction, November 6-9, 2016, Campos do Jordão, SP, Brazil.

CAMPERO, C.M.; ANDERSON, M.L.; CONOSCIUTO, G.; ODRIOZOLA, H.; BRETSCHNEIDER, G.; POSO, M.A. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. **Veterinary Record**, v.143, p.228–229, 1998.

CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; LAGOMARSINO, H.; ODEON, A.C.; CASTRO, M.; VISCA, H. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum* seropositive cows. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.50, p.458–60, 2003.

CASPE, S.G.; MOORE, D.P.; LEUNDA, M.R.; CANO, D.B.; LISCHINSKY, L.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ECHAIDE, I.G.; BACIGALUPE, D.; ORTEGA-MORA, L.M.; ODEÓN, A.C.; CAMPERO, C.M. The Neosporacanium-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. **Veterinary Parasitology**, v.189, p.171–181, 2012.

CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O.; ARRUDA, R.P. Use of CMXRos and JC-1 on mitochondrial function evaluation, associated to fluorescent probes to plasmatic and acrosomal membranes evaluation in bovine spermatozoa. **Acta Science Veterinary**, v.33, p.321, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2–4, p. 119–131, 2008.

CHI, J.; VANLEEUEWEN, J.A.; WEERSINK, A.; KEEFE, G.P. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. **Preventive Veterinary Medicine**, v.55, p.137–153, 2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; ARNAIZ-SECO, I.; MORENO, B.; ADURIZ, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. **Theriogenology**, v.65, p.629–641, 2006.

CONRATHS, F.J.; ORTEGA-MORA, L.M. Options for control of protozoal abortion in ruminants: practical experience. Conclusions, p. 229. Workshop Session T. 20th Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol. Christchurch, New Zealand, 16 to 20 October 2005.

DAVISON, H.C.; OTTER, A.; TREES, A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle.

International Journal Parasitology, v.29, p.1683–1689, 1999.

DAVISON, H.C.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; WILLIAMS, D.J.; KELLY, D.F.; TREES, A.J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.163–168, 2001.

DEL OLMO, E., BISBAL, A., MAROTO-MOLARES, A., GARCÍA-ALVAREZ, O., RAMON, M., JIMENEZ-RABADAN, P., MARTÍNEZ-PASTOR, F. SOLER, A.J., GARDE, J.J., FERNANDEZ-SANTOS, M.R. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, v.138, p.102-109, 2013.

DE OLIVEIRA, V.S.F.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L.M.; BORGES, L.M.F.; DA SILVA, A.C. Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in an embryo transfer center. *Veterinary Parasitology*, v.173, p.206–210, 2010.

DE MEERSCHMAN, F.; FOCANT, C.; BOREUX, R.; LECLIPTEUX, T.; LOSSON, B. Cattle neosporosis in Belgium: a case-control study in dairy and beef cattle.

International Journal for Parasitology, v.30, p.887–890, 2000.

DIEMER, T.; WEIDNER, W.; MICHELMANN, H.W.; SCHIEFER, H.G.; ROVAN, E.; MAYER, F. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. **International Journal Andrology**, v.19, p.271-277, 1996.

DIJKSTRA, T.; BARKEMA, H.W.; EYSKER, M.; WOUDA, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.209–215, 2001a.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.747–752, 2001b.

DIJKSTRA, T., BARTELS, C.J.M.; WOUDA, W. Control of bovine neosporosis: experiences from The Netherlands. Session M. Diagnosis and control of protozoan-associated abortion in ruminants, p. 191. 20th Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol., Christchurch, New Zealand, 16 to 20 October 2005.

DOOSTI, A.; KHAMESIPOUR, F.; NEKOEI, S.; LUTVIKADIC, I. Survey for the presence of *Neospora caninum* on frozen bull's semen samples by PCR assay. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.5, n.1, p.7-12, 2015.

DORADO, J.; ALCARÁZ, L.; DUARTE, N.; PORTERO, J. M.; ACHA, D.; HIDALGO, M. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.211-218, 2011.

DORADO, J., ALCARAZ, L., GÁLVEZ, M. J., ACHA, D., ORTIZ, I. URBANO, M., HIDALGO, M. Single-layer centrifugation through PureSperm® 80 selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.140, p.232-240, 2013.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.192, p.1269–1285, 1988.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ANDERSON, M.L.; DAVIS, S.W.; SHEN, S.K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.201, p.709–713, 1992.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.1–59, 1996.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; MCALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.929–946, 2002.

DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle. **Journal of Parasitology**, v.89, p.42–56, 2003.

DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUDE, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, p.267–289, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Review**, v.20, p.323–367, 2007.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.90–108, 2011.

EIRAS, C.; ARNAIZ, I.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L.M.; SANJUAN, M.L.; YUS, E.; DIEGUEZ, F.J. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. **Preventive Veterinary Medicine**, v.98, p.128–132, 2011.

EL-MULLA, K.F.; KOHN, F.M.; DANDAL, M. In vitro effect of *Escherichia coli* on human sperm acrosome reaction. **Archives of Andrology**, 37: 73-78, 1996.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTEGARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, p.1504-1518, 2005.

FERREIRA, F. M.; WENTZ, I.; SCHEID, I. R. Comportamento de monta e características seminais de suínos jovens landrace e large white. **Ciência Rural**, v. 35, p.131-137, 2005.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D.; DELL'AQUA Jr, J.A.; PAPA, F.O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **Animal Reproduction**, v.9, p.941, 2012.

FONDEVILA, D.; ANOR, S.; PUMAROLA, M.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.77, p.187–189, 1998.

FURUTA, P.I.; MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; GODOY, G.S.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. *Neospora caninum* infections in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v.134, p.1931-1939, 2007.

GIBNEY, E.H.; KIPAR, A.; ROSBOTTOM, A.; GUY, C.S.; SMITH, R.F.; HETZEL, U.; TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. **Internacional Journal for Parasitology**, v.38, p.579–588, 2008.

GONDIM, L.F.P.; GAO, L.; MCALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v.88, n.6, p.1159-1163, 2002.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.159-161, 2004.

GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; WYSS, R.; THUR, B.; BUSATO, A.; STARK, K.D.; MULLER, N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. **Internacional Journal for Parasitology**, v.28, p.679–691, 1998.

GUIDO, S.; KATZER, F.; NANJIANI, I.; MILNE, E.; INNES, E.A. Serology-based diagnosis for the control of bovine neosporosis. **Trends in Parasitology**, v.32, n.2, p.131-143, 2016.

HADDAD, J.P.A.; DOHOO, I.R.; VANLEEWEN, J.A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle—a Canadian perspective. **Canadian Veterinary Journal** V.46, p.230–243, 2005.

HALL, C.A.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.231–41, 2005.

HASLER, B.; REGULA, G.; STARK, K.D.C.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p.230–253, 2006a.

HASLER, B., STARK, K.D.C.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p.254–283, 2006b.

HECKER, Y.P.; MOORE, D.P.; QUATTROCCHI, V.; REGIDOR-CERRILLO, J.; VERNA, A.; LEUNDA, M.R.; MORRELL, E.; ORTEGA-MORA, L.M.; ZAMORANO, P.; VENTURINI, M.C.; CAMPERO, C.M. Immune response and protection provided by live tachyzoites and native antigens from the NC-6 Argentina strain of *Neospora caninum* in pregnant heifers. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.436–446, 2013.

HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.219, p.632–635, 2001.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v. 35, p.283-290, 2004.

HUSSAIN, S. S.; AHMAD, N.; ALA-UD-DIN; CHAUDHRY, N.A. Effect of different antibiotics on motility and liveability of spermatozoa and viable bacterial count in buffalo semen. **Pakistan Veterinary Journal**, v.10, p.171-174, 1990.

INNES, E.A. The host–parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.134, p.1903–1910, 2007.

JOHANNISSON, A., MORRELL, J. M., THORÉN, J., JONSSON, M., DALIN, A.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.119-128, 2009.

KAUR, M., TRIPATHI, K.K.; BANSAL, M.R.; JAIN, P.K.; GUPTA, K.G. Bacteriology of the cervix in cases of infertility: effect on human sperm. **American Journal of Reproduction, Immunology and Microbiology**, v.12, p.21-24, 1986.

LARSON, R.L., HARDIN, D.K.; PIERCE, V.L. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.224, p.1597–1604, 2004.

LINDSAY, D.S.; RIPPEY, N.S.; COLE, R.A.; PARSONS, L.C.; DUBEY, J.P.; TIDWELL, R.R.; BLAGBURN, B.L. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. **American Journal Veterinary Research**, v.55, n.7, p.976-981, 1994.

LINDSAY, D.S.; BUTLER, J.M.; RIPPEY, N.S.; BLAGBURN, B.L. Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolate reductase/thymidylate synthase inhibitors against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine. **American Journal Veterinary Research**, v.57, n.1, p.68-72, 1996.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.327-33, 1999.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.; JOINEAU, M.E. et al. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. **Vet. Rec.** v.153, p.366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B. et al. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.103-109, 2004.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L.M. et al. Isolation of *Neospora caninum* from kidney and brain of a bovine foetus and molecular characterization in Brazil. **Experimental Parasitology**, v.185, p.10-16, 2018.

LOPEZ-GATIUS, F.; LOPEZ-BEJAR, M.; MURUGAVEL, K.; PABON, M.; FERRER, D.; ALMERIA, S. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. **Journal of Veterinary Medicine Serie B**, v.51, p.348-352, 2004.

LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J.L.; GARBAYO, J.M.; ALMERIA, S. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora* seropositive dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine Serie B**, v.52, p.88-92, 2005.

LOPEZ-GATIUS, F.; ALMERIA, S.; DONOFRIO, G.; NOGAREDA, C.; GARCIA-ISPIERTO, I.; BECH-SABAT, G.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J.L.; PABON, M.; DE SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Theriogenology**, v.68, p.1067-1073, 2007.

MACALDOWIE, C.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.; BARTLEY, P.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. **Journal of Comparative Pathology**, v.131, p.142-156, 2004.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, v.33, p.183-193, 2009.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 983-991, 1998.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.

MCALLISTER, M.M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D.G.; Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.217, p.881–887, 2000.

MCALLISTER, M.M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinical Food Animal**, v.32, p.443–463, 2016.

MCCANN, C.M.; MCALLISTER, M.M.; GONDIM, L.F.P.; SMITH, R.F.; CRIPPS, P.J.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D.J.L.; TREES, A.J. *Neospora caninum* in cattle: experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. **Internation Journal of Parasitology**, v.37, p.1631–1639, 2007.

MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**, v.140, p.52–70, 2014.

MOORE, D.P.; CAMPERO, C.M.; ODEON, A.C.; POSSO, M.A.; CANO, D.; LEUNDA, M.R.; BASSO, W.; VENTURINI, M.C.; SPATH, E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.107, p.303–316, 2002.

MORRELL, J. M. Update on semen technologies for animal breeding. **Reproduction Domestic Animals**, v.41, p.63-67, 2006.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v.100, p.633–636, 2007.

NIETFELD, J.C.; DUBEY, J.P.; ANDERSON, M.L.; LIBAL, M.C.; YAEGER, M.J.; NEIGER, R.D. *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.223–226, 1992.

ORTEGA-MORA, L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.301–308, 2003.

ORTEGA-MORA, L. M., FERNANDEZ-GARCIA, A.; GOMEZ-BAUTISTA, M. Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. **Acta Parasitology**, v.51, p.1–14, 2006.

OTRANTO, D.; LLAZARI, A.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; DI REGALBONO, A.F.; BADAN, M.; CAPELLI. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.7-18, 2003.

O'TOOLE, D.; JEFFREY, M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. **Veterinary Record** v.121, p.563–566, 1987.

PARE, J.; FECTEAU, G.; FORTIN, M.; MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.213, p.1595–1598, 1998.

PARE, J.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Congenital *Neospora* infection in dairy cattle. **Veterinary Record**, v.134, p.531–532, 1994.

PARISH, S.M.; MAAG-MILLER, L.; BESSER, T.E.; WEIDNER, J.P.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D.P.; LEATHERS, C.W. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.191, p.1599–1600, 1987.

PAUFLER, S. K.; MITAUTOREN. Kunstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Hannover: 1974.

PAZ, G.F.; LEITE, R.C.; ROCHA, M.A. Associação entre sorologia para *Neospora caninum* e taxa de preñez em vacas receptoras de embriões. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p.1323–1325, 2007.

PETERS, M.; LUTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal of Parasitology**, v.31, p.1144–1148, 2001.

PHILPOTT M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **Brazilian Veterinary Journal**, v.149, n.4, p.339-369, 1993.

QUINTANILLA-GOZALO, A.; PEREIRA-BUENO, J.; SEIJAS-CARBALLEDO, A.; COSTAS, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Observational studies on *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.900–906, 2000.

REICHEL, M. P. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, v.78, p.258–261, 2000.

REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? **Veterinary Parasitology**, v.142, p.23–34, 2006.

REICHEL, M.P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA, M.; GONDIM, L.F.; ELLIS, J.T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v.43, p.133–142, 2013.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; BLANCO-MURCIA, J.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; RISCO-CASTILLO, V.; ORTEGA-MORA, L.M. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. **Veterinary Research**, 40: 49, 2009.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; PRENAFETA, A.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L.M. Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by na inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.220–229, 2011.

ROMERO, J.J.; VAN BRED, S.; VARGAS, B.; DOLZ, G.; FRANKENA, K. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. **Theriogenology** v.64, p.1928–1939, 2005.

ROSBOTTOM, A.; GUY, C.S.; GIBNEY, E.H.; SMITH, R.F.; VALARCHER, J.F.; TAYLOR, G.; WILLIAMS, D.J.L. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. **Parasite Immunology**, v.29, p.219–228, 2007.

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, E.H.; GUY, C.S.; KIPAR, A.; SMITH, R.F.; KAISER, P.; TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J.L. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. **Infection and Immunity**, v.76, p.2352–2361, 2008.

ROSBOTTOM, A.; GIBNEY, H.; KAISER, P.; HARTLEY, C.; SMITH, R.F.; ROBINSON, R.; KIPAR, A.; WILLIAMS, D.J.L. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. **PLoS ONE** 6, e15799–e15800, 2011.

SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.663–677, 2000.

SANDERSON, M.W.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.15–24, 2000.

SANSONE, G.; NASTRI, M.J.F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.55–76, 2000.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWALD, A.; CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.87–98, 1998.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTÍNEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, v.135, n. 3–4, p. 197–203, 2006.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; MARTINEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; DEL-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v.67, p.1175–1184, 2007a.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R. A.; MARTINEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L. M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v.67, p.729–737, 2007b.

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P.G. PCR assay for detection of *Neospora caninum* in fresh and frozen semen specimens of Iranian bulls. **World Applied Science Journal**, v.17, n.6, p.742-749, 2012.

STALLCUP, S.S.; MCCARTNEY, H.K. Toxicity to bull spermatozoa of terramycin hydrochloride and its use as an antibacterial agent in diluents. **Journal dairy Science**, v.36, p.293, 1953.

THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.205–209, 1989.

THORNTON, R.N.; GAJADHAR, A.; EVANS, J. *Neospora* abortion epidemic in a dairy herd. **New Zealand Veterinary Journal**, v.42, p.190–191, 1994.

THORNTON, R.N.; THOMPSON, E.J.; DUBEY, J.P. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v.39, p.129–133, 1991.

THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. **American Journal Veterinary Research**, v.57, p.1559–1562, 1996.

THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. **American Journal Veterinary Research**, v.58, p.1381–1385, 1997.

TREES, A.J.; DAVISON, H.C.; INNES, E.A.; WASTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International Journal of Parasitology**, v.29, p.1195–1200, 1999.

TREES, A.J.; WILLIAMS, J.L. Neosporosis in the United Kingdom. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.891–893, 2000.

TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J.L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, **Trends in Parasitology**, v.21, p.558–561, 2005.

TROIANO, L.; GRANATA, A.M.; COSSARIZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in Human sperm cells: A flow cytometry analysis with

implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, v.241, p.384-393, 1998.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O.J.M.; JAKUBEK, E-BB. THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJORKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1467-72, 1998.

VARNER, D.D. Composition of seminal extenders and its effect on motility of equine spermatozoa. In: Proceedings of the Annual Meeting Society for Theriogenology, p.146-150, 1991.

WALDNER, C.L.; JANZEN, E.D.; RIBBLE, C.S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. **Journal American Veterinary Medicine Association**, 213:685-690, 1998.

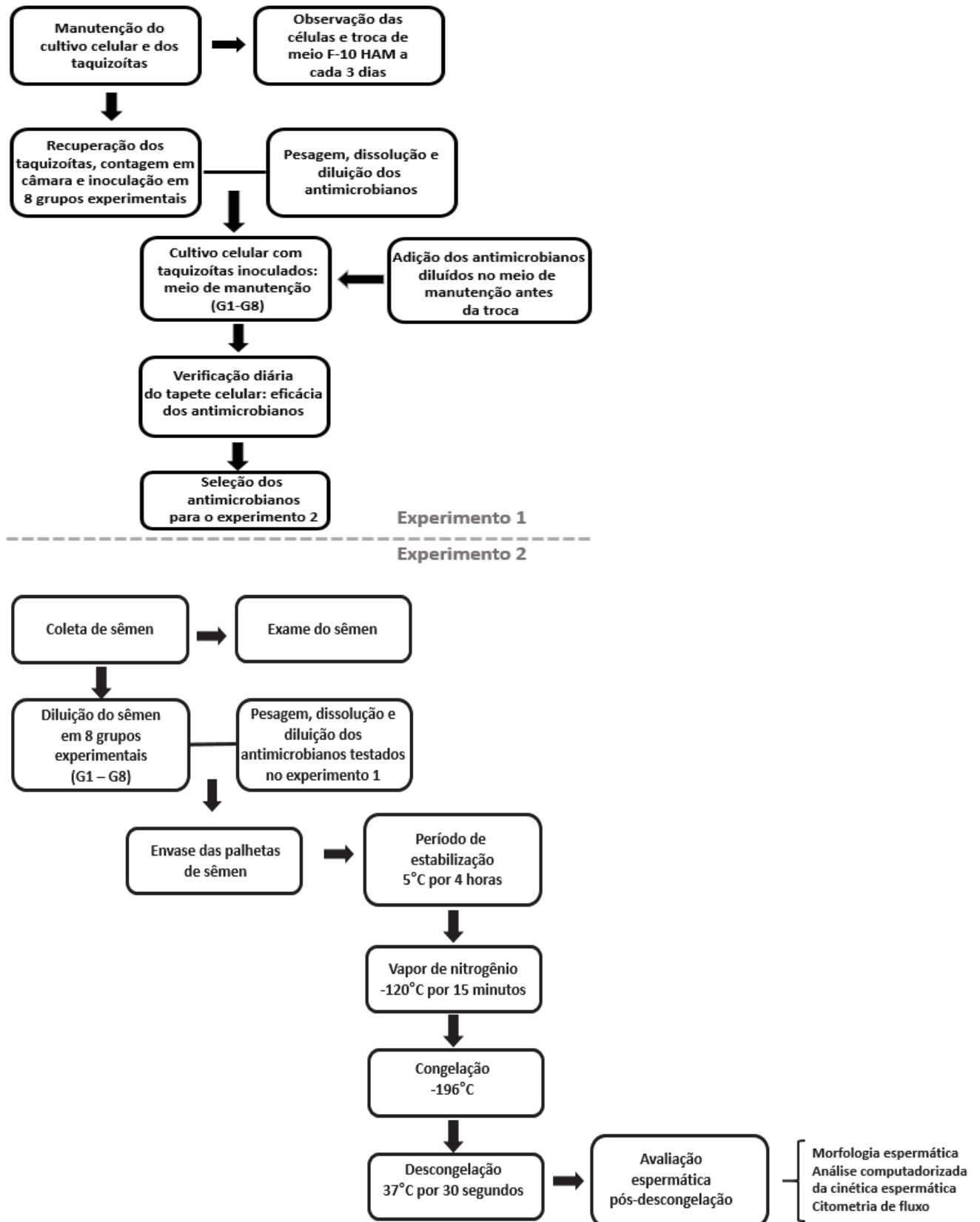
WEBER, F.H.; JACKSON, J.A.; SOBECKI, B.; CHOROMANSKI, L.; OLSEN, M.; MEINERT, T.; FRANK, R.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of *Neospora*-associated fetal loss in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.20, p.99-105, 2013.

WILLIAMS, D.J.L.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; TASKER, L.; SMITH, R.F.; MACEACHERM, K.; CRIPPS, J.P.; KELLY, D.F.; TREES, A.J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**, v.121, p.347-58, 2000.

WOUDA, W.; MOEN, A.R.; SCHUKKEN, Y.H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. **Theriogenology**, v.49, p.1311-1316, 1998.

WOUDA, W.; DIJKSTRA, T.; KRAMER, A.M.H.; MAANEN, C.V.; BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **International Journal Parasitology**, v.29, p.1677-1682, 1999.

ANEXO 1 - FLUXOGRAMA DA EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS 1 E 2.



ANEXO 2 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 113/2016, referente ao projeto “**Profilaxia da neosporose no sêmen de touros**” sob a responsabilidade de **Romildo Romualdo Weiss** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 03/11/2016.


Vigência do projeto	Janeiro/2017 até Fevereiro/2018
Espécie/Linhagem	<i>Bovis</i> sp (bovino) / Nelore
Número de animais	1
Peso/Idade	1200 kg / 7 anos
Sexo	Macho
Origem	Fazenda em Conselheiro Mairinck – PR

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 113/2016, regarding the project “**Neosporosis's prophylaxis in bull semen**”, under **Romildo Romualdo Weiss** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 03/11/2016.

Duration of the project	January/2017 until February/2018
Specie/Line	<i>Bovis</i> sp (bovine) / Nelore
Number of animals	1
Wheight/Age	1200 kg / 7 years
Sex	Male
Origin	Farm in Conselheiro Mairinck – PR

Curitiba, 3 de novembro de 2016.


 Simone Tostes de Oliveira Stedile
Coordenadora CEUA-SCA